



A35992-PCT-USA-A (072667.0191)
PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Freyssinet *et al.*
Serial No. : 10/665,460 Examiner : To Be Assigned
Filed : September 19, 2003 Group Art Unit: To Be Assigned
For : PEPSIN-SENSITIVE MODIFIED *BACILLUS THURINGIENSIS*
INSECTICIDAL TOXIN

SUBMISSION OF CERTIFIED PRIORITY DOCUMENT

I hereby certify that this paper is being deposited with the United States Postal Service as first class mail in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria VA 22313-1450

October 16, 2003

Date of Deposit

Rochelle K. Seide

Attorney Name

Rochelle K. Seide
Signature

32,300

PTO Registration No.

October 16, 2003

Date of Signature

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria VA 22313-1450

Dear Sir:

Applicant submits herewith a certified priority document pursuant to 37 C.F.R. §1.55(a)(1). Applicant respectfully requests that the Examiner acknowledge this claim for

NY02:461853.1

foreign priority under 35 U.S.C. § 119 when issuing any Office Actions in the above-identified application.

Applicant believes that no fee is required in conjunction with this communication. However, the Commissioner is hereby authorized to charge any fees associated with this filing to Deposit Account No. 02-4377. Please credit any overpayment of fees associated with this filing to the above-identified deposit account. Two copies of this communication are enclosed.

Respectfully submitted,

BAKER BOTTS L.L.P.

A handwritten signature in cursive script, reading "Rochelle K. Seide", written over a horizontal line.

Bradley B. Geist
PTO Reg. No. 27,551

Rochelle K. Seide, Ph.D.
PTO Reg. No. 32,300

Attorneys for Applicant

30 Rockefeller Plaza
New York, NY 10112-4498

(212) 408-2626

Enclosure

1



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 20 Mars 2007

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04
Télécopie : 33 (1) 42 93 59 30
www.inpi.fr

ter depot

Toxine insecticide de *Bacillus thuringiensis* modifiée sensible à la pepsine

La présente invention concerne la dégradation des protéines Cry de *Bacillus thuringiensis* dans le tractus digestif des mammifères. Elle a pour objet des protéines Cry de *Bacillus thuringiensis* dont la séquence peptidique a été modifiée de manière à les rendre sensibles aux enzymes spécifiques du tractus digestif des mammifères, en particulier aux pepsines. Selon cette invention, les protéines Cry sont modifiées par insertion de sites de coupure par la pepsine dans leur séquence peptidique. L'invention concerne également des plantes transformées exprimant ces protéines Cry modifiées.

Les bactéries de l'espèce *Bacillus thuringiensis* (ci-après *Bt*) sont bien connues pour les toxines insecticides qu'elles produisent. Ces bactéries à Gram-positif forment un cristal protéique parasporal au cours de leur phase de croissance stationnaire, lequel cristal est largement responsable de leur activité insecticide. Le cristal de ces bactéries est constitué d'une toxine insecticide de nature protéique nommée protéine Cry et codée par un gène *cry*. De par ses propriétés insecticides, cette protéine Cry a été employée en protection des cultures contre les insectes ravageurs, en tant que solution alternative aux insecticides de synthèse. Actuellement, cette utilisation agronomique se réalise essentiellement par deux méthodes, l'épandage direct du produit en tant que biopesticide, et la transformation génétique des plantes cultivées avec un gène codant pour une protéine Cry. Selon les souches de *Bt* dont elles sont issues, les protéines Cry ont des activités insecticides vis-à-vis de spectres d'insectes différents. Les principaux ordres d'insectes contre lesquels sont actives les toxines Cry sont les Lépidoptères, les Coléoptères et les Diptères, mais certaines toxines sont efficaces vis-à-vis d'autres ordres d'insectes. L'ensemble des protéines Cry isolées des différentes souches de *Bt* est rassemblé dans une classification en fonction de leurs homologues de séquences, et un code leur est attribué afin de les distinguer (Crickmore et al., 1998, Microbiol. Molec. Biol. Review 62(3), 807-813). L'intérêt de l'utilisation de ces toxines en agriculture réside donc dans leur spécificité d'action vis-à-vis d'un ou de plusieurs ordres d'insectes donnés, mais aussi dans leur absence de toxicité vis-à-vis des mammifères, des oiseaux, des amphibiens et des reptiles.

Cette absence de toxicité vis-à-vis des mammifères a permis le développement de la culture de plantes transgéniques exprimant une protéine Cry et l'utilisation des graines de ces plantes pour l'alimentation humaine et animale. Toutefois, bien que non toxiques vis-à-vis des

mammifères, certaines de ces protéines sont peu dégradées dans le tractus digestif des mammifères, et cette absence de dégradation conduit à une persistance relativement longue de la toxine dans le tractus digestif desdits mammifères. En outre, l'absence de persistance des protéines Cry dans le tractus digestif des mammifères est un des critères pris en compte par les autorités administratives (par exemple, l'Agence pour la Protection de l'Environnement - EPA - des Etats-Unis) délivrant des autorisations de mise sur le marché alimentaire de graines contenant ces protéines ou de produits issus de ces graines.

La présente invention permet de pallier l'inconvénient ci-dessus mentionné. Cette invention est basée sur le principe selon lequel la stabilité de certaines protéines Cry dans le tractus digestif des mammifères serait due à une absence de sensibilité de ces protéines aux enzymes spécifiques dudit tractus digestif, en particulier aux protéases. La solution à ce problème réside donc dans l'intégration artificielle de sites spécifiques, propres aux enzymes du tractus digestif des mammifères, dans la protéine Cry. La présente invention a donc pour objet des protéines Cry modifiées sensibles aux enzymes spécifiques du tractus digestif des mammifères, en particulier les protéases spécifiques de l'estomac des mammifères, et plus particulièrement les pepsines. La pepsine est une enzyme particulière de la famille des protéases, et elle est majoritairement présente dans l'estomac des mammifères (95% des protéases stomacales). Il s'agit d'une protéase à site aspartique agissant à un pH optimum égal à 2. La pepsine est une enzyme de choix comme source de dégradation des protéines Cry car elle n'est pas présente dans le tube digestif des insectes, en particulier des lépidoptères dont le pH du tube digestif est compris entre 10 et 11 (Terra, W. B. and C. Ferreira. 1994. Insect digestive enzymes : properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 109B : 1-62.). Cette absence de pepsine chez les insectes est donc une garantie que l'introduction de sites spécifiques à la pepsine dans les protéines Cry ne présente pas de risque d'augmentation de leur dégradation dans le tube digestif des insectes. La présente invention est donc une solution au problème technique ci-dessus exposé, à savoir une augmentation de la sensibilité des protéines Cry aux enzymes du tractus digestif des mammifères, sans altération des propriétés insecticides desdites protéines Cry.

Toutefois, la protéine Cry est une protéine très organisée dont la forme activée est composée de trois domaines, et dans laquelle les relations structure-fonction sont très fortes dans et entre les domaines. Ce niveau d'organisation important des protéines Cry ne permet pas l'insertion aléatoire de mutations dans la protéine. En effet, l'insertion de sites de coupure spécifiques aux enzymes stomacales de mammifères ne doit pas altérer les propriétés insecticides

des toxines.

Les protéines Cry sont naturellement produites par la bactérie *Bacillus thuringiensis* sous forme de protoxines inactives. Le mode d'action naturel de ces protéines implique la solubilisation du cristal protéique dans l'intestin de l'insecte, la dégradation protéolytique de la protoxine libérée, la fixation de la toxine activée sur les récepteurs de l'intestin des insectes, et l'insertion de la toxine dans la membrane apicale des cellules intestinales pour créer des pores ou canaux ioniques. La dégradation protéolytique de la protoxine dans l'intestin des insectes est réalisée sous l'action conjuguée du pH alcalin et des protéases à sites sérines (essentiellement la trypsine) du suc digestif (Schnepf *et al.*, 1998).

Les toxines Cry sont constituées de trois domaines structuraux, le domaine I, le domaine II et le domaine III. Le domaine I occupe environ la moitié N-terminale de la toxine activée. Les domaines II et III occupent environ chacun un quart de la toxine activée. Le domaine III est situé à l'extrémité C-terminale de la toxine activée. Chaque domaine de la protéine Cry possède sa propre structure et sa propre fonction.

Le domaine I est constitué de sept hélices alpha, 6 hélices amphiphiles et une hélice hydrophobe, reliées entre-elles par des boucles interhélices constituées de quelques acides aminés. Ce domaine est le domaine transmembranaire, responsable de la formation du pore ou canal ionique (Aronson *et al.*, 1995 ; Chen *et al.*, 1993 ; Manoj-Kumar et Aronson, 1999 ; Masson *et al.*, 1999 ; Rang *et al.*, 1999 ; Coux *et al.*, 1999). La formation du pore transmembranaire par les hélices alpha du domaine I implique en fait quatre protéines Cry formant un pore complet avec leurs quatre hélices alpha 4 respectives (Masson *et al.*, 1999). Il se forme donc un pore cylindrique de quatre hélices α 4. L'intérieur de ce pore est constitué par les faces hydrophiles des hélices amphiphiles, les résidus chargés négativement étant présents sur les faces hydrophiles, ils se retrouvent dans la lumière du pore, en milieu aqueux et remplissent leur fonction de transport d'ions. L'extérieur du pore est constitué par les faces hydrophobes qui ancrent le pore dans la membrane lipidique. La formation du pore par les hélices α du domaine I implique donc des relations structure-fonction très fortes et des changements de conformation au cours du temps. L'introduction de mutations dans les hélices alpha du domaine I présente donc une forte probabilité de perturbation de la fonction de ce domaine, et donc de l'activité de la toxine.

Les domaines II et III de la toxine activée sont constitués de feuillets béta, eux aussi sous une forme très compactée. Ces deux domaines sont impliqués dans la reconnaissance du site récepteur (spécificité) et dans la stabilité de la toxine (Abdul-Rauf et Ellar, 1999 ; Dean *et al.*, 1996 ; Hussain *et al.*, 1996 ; Lee et al., 1999 ; Rajamohan *et al.*, 1996, 1998 ; Wu et Dean, 1996). Des échanges de domaines III induisent des changements de spécificité (de Maagd *et al.*, 1999) . Cette région est beaucoup moins conservée, donc plus variable que le domaine I. Elle est impliquée dans la spécificité de chaque toxine. Cette variabilité et ces interactions propres à chaque toxine interviennent dans la nature du spectre d'hôtes très spécifique de chaque toxine et sont impliqués dans la reconnaissance de sites récepteurs différents. La reconnaissance du récepteur est effectuée par des boucles du domaine II et du domaine III et la conformation de ces boucles varie subtilement d'une toxine à l'autre en fonction de l'arrangement et des interactions entre les domaines II et III. Le domaine I interfère aussi avec les deux autres domaines et influence la conformation générale (Rang *et al.*, 1999, 2001). En outre, très peu de choses sont connues sur les relations structure-fonction au sein de ces deux domaines et aucune information n'est actuellement disponible sur la conformation nécessaire à la reconnaissance d'un site récepteur. Il est donc très difficile de présager des conséquences de l'introduction de modifications dans les domaines II et III sur la spécificité, la capacité à reconnaître les sites récepteurs et la toxicité des protéines Cry. Par ailleurs, on sait que des mutations générées dans les domaines II et III induisent très souvent une déstabilisation de la toxine chez l'insecte, entraînant une perte de toxicité.

Des ponts salins existent également entre les domaines I et II des protéines Cry. Ces ponts jouent un rôle important dans la stabilité de la toxine et dans son fonctionnement. L'élimination artificielle de ces ponts chez Cry1Aa1 montre que les protoxines et toxines activées sont moins stables que la protéine parentale (Vachon *et al.*, 2000). Ces ponts salins sont présents entre le domaine II et l'hélice $\alpha 7$ du domaine I. L'importance reconnue de ces ponts laisse supposer que des mutations dans le domaine II et l'hélice $\alpha 7$ du domaine I présentent un risque élevé de perturbation du fonctionnement des protéines Cry.

Description

La présente invention concerne une protéine Cry modifiée sensible à la pepsine, caractérisée en ce qu'elle possède au moins un site de coupure par la pepsine additionnel.

Par protéine Cry, on entend la protéine insecticide produite par une souche de bactérie *Bacillus thuringiensis* (ci après désignée *Bt*), dont les différents holotypes existants et à venir sont référencés par le comité de classification de *Bt* (Crickmore, 2001) et accessibles sur le site Internet http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html. En particulier, cette protéine Cry est codée par un gène *cry*, soit naturellement par la bactérie *Bt*, soit de manière recombinante dans un organisme hôte transformé avec un gène *cry* ou avec un gène comprenant au moins la séquence codante d'une protéine Cry. Les protéines Cry selon l'invention comprennent également des protéines Cry dont la séquence a été artificiellement modifiée de manière à augmenter leur activité insecticide ou leur résistance aux conditions de traitement. Cette définition inclut également des fragments de protéines Cry conservant l'activité insecticide, telles que les protéines Cry tronquées ne comportant que la partie N-terminale d'une protéine Cry complète, en particulier le domaine I de cette protéine (WO 94/05771). Sont également comprises les protéines Cry fusionnées telles que décrites dans la demande de brevet internationale WO 94/24264. De manière préférée, la protéine Cry selon l'invention est sélectionnée parmi les protéines Cry1, Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry16, Cry17, Cry19, ou Cry20. De manière préférentielle, il s'agit de la protéine Cry9C, et de préférence la protéine Cry9Ca1 (Lambert et al., Appl. Environm. Microbiol. 62, 80-86; WO 94/05771). En particulier, la présente invention s'adapte également à toute protéine Cry dont la toxicité a été améliorée, comme par exemple celles décrites dans les demandes de brevets WO 97/49814 ou WO 99/00407.

Selon la présente invention, la protéine Cry est modifiée. On entend par protéine Cry modifiée, une protéine Cry dont la séquence peptidique est différente de la séquence de la protéine Cry native dont elle est issue. Cette différence de séquences est le résultat de modifications artificielles introduites par ingénierie génétique, notamment l'insertion ou la substitution de résidus acides aminés spécifiques dans ladite séquence peptidique. En particulier, la protéine Cry modifiée est produite par modification de la séquence nucléotidique la codant, notamment par la technique de mutagenèse dirigée bien connue de l'homme du métier (Hutchinson C.A et al., 1978, J. Biol. Chem. 253: 6551). De manière préférée, la modification de la protéine Cry consiste en une substitution de résidus acides aminés.

La protéine Cry modifiée selon l'invention est sensible à la pepsine. La pepsine focalise son action protéolytique au niveau de sites de coupure spécifiques constitués par les acides aminés leucine, phénylalanine et l'acide glutamique. La protéolyse est réalisée du côté C-terminal du résidu concerné. Par sensible à la pepsine, on entend selon l'invention la propriété pour la protéine Cry modifiée de subir une protéolyse par la pepsine. La protéolyse de la protéine Cry conduit à la perte partielle ou totale de l'activité insecticide de ladite protéine. La sensibilité à la pepsine peut donc se mesurer par mise en contact, de préférence *in vitro*, d'une protéine Cry modifiée selon l'invention avec une pepsine, puis mesure de la perte d'activité insecticide de ladite protéine Cry modifiée en comparaison avec une protéine Cry native, non modifiée selon l'invention. A titre d'exemple, les tests décrits dans les exemples 7 et 8 peuvent être employés pour mesurer la sensibilité à la pepsine d'une protéine Cry selon l'invention. Alternativement, la technique du Western blot peut également être utilisée pour mesurer ladite sensibilité à la pepsine. Par cette technique, la sensibilité est mesurée par l'observation de la dégradation structurelle de la protéine Cry modifiée après contact avec une pepsine. Cette observation consiste en la disparition ou l'atténuation d'intensité d'une bande correspondant à la protéine Cry sur une membrane de transfert d'un gel d'électrophorèse par rapport à une protéine Cry native, non modifiée selon l'invention. La mise en œuvre de ces techniques fait partie des connaissances générales de l'homme du métier.

La protéine Cry modifiée selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle possède au moins un site de coupure par la pepsine additionnel. Par "site de coupure par la pepsine", on entend un site constitué d'au moins un résidu acide aminé reconnu comme site de protéolyse par la pepsine. Les résidus acides aminés reconnus par la pepsine sont la leucine, phénylalanine ou l'acide glutamique. Par "site de coupure par la pepsine additionnel", on entend un site de coupure supplémentaire par rapport à la protéine Cry native telle que produite par la bactérie *Bt*.

De manière préférée, le site de coupure par la pepsine additionnel est représenté par un résidu acide aminé sélectionné parmi les résidus leucine, phénylalanine ou acide glutamique. Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la protéine Cry modifiée possède plusieurs sites de coupure par la pepsine additionnels représentés par un même résidu acide aminé. Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la protéine Cry modifiée possède plusieurs sites de coupure par la pepsine additionnels représentés par des résidus acides aminés différents.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la protéine Cry modifiée selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle possède au moins un site de coupure par la pepsine additionnel dans au moins une des boucles inter-hélices alpha du domaine I. Par boucles inter-hélices alpha du domaine I", on entend les chaînes peptidiques reliant les sept hélices alpha du domaine I des protéines Cry telles que décrites dans Grochulski et al. (1995) et Li et al. (1991). Selon l'invention, la protéine Cry doit posséder au moins un site de coupure par la pepsine additionnel. En outre, ledit site de coupure additionnel se trouve dans au moins une des boucles inter-hélices alpha du domaine I. Le terme additionnel s'entend donc comme supplémentaire par rapport au nombre de sites de coupure par la pepsine naturellement présents dans les boucles inter-hélices alpha du domaine I de la protéine Cry native telle que produite par la bactérie *Bt*. Cette définition signifie que la protéine Cry modifiée selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle possède un nombre de sites de coupure par la pepsine dans ses boucles inter-hélices alpha du domaine I supérieur au nombre de ces sites dans la même protéine Cry native telle que produite par la bactérie *Bt*, la différence entre lesdits nombres étant au minimum égale à 1.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la protéine Cry modifiée selon l'invention possède au moins un site de coupure par la pepsine dans la boucle inter-hélices alpha reliant les hélices alpha 3 et 4 du domaine I.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, la protéine Cry modifiée est une protéine Cry9C modifiée. De préférence, la protéine Cry modifiée est une protéine Cry9Ca1 modifiée, possédant un site de coupure par la pepsine positionné sur le résidu acide aminé 164. En particulier, le résidu arginine naturellement présent en position 164 sur la protéine Cry9Ca1 est remplacé par un résidu acide aminé choisi parmi les résidus leucine, phénylalanine ou acide glutamique sur la protéine Cry9Ca1 modifiée selon l'invention. De manière préférée, la protéine Cry9Ca1 modifiée selon l'invention est sélectionnée parmi les protéines Cry dont les séquences sont représentées par les identificateurs SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:8.

La présente invention concerne également une protéine Cry modifiée sensible à la pepsine, caractérisée en ce que les sites de coupure par la pepsine additionnels qu'elle possède sont introduits par substitution de résidus acide aspartique par des résidus acide glutamique, substitution de résidus tryptophane par des résidus phénylalanine, et substitution de résidus valine ou isoleucine par des résidus leucine. De préférence, le taux de substitution que possède ladite protéine Cry modifiée est de 25%. Par taux de substitution, on entend le pourcentage de

ter de p...
résidus acides aminés de la protéine Cry native qui sont remplacés par des résidus acides aminés correspondant à des sites de coupure par la pepsine dans la protéine Cry modifiée de l'invention.

La présente invention a également pour objet un procédé d'augmentation de la sensibilité à la pepsine des protéines Cry, caractérisé en ce que l'on introduit au moins un site de coupure par la pepsine additionnel dans lesdites protéines Cry. Par "augmentation de la sensibilité à la pepsine des protéines Cry", on entend un accroissement de la sensibilité à la pepsine des protéines Cry obtenues par ledit procédé par rapport aux protéines Cry natives correspondantes, cet accroissement se traduisant par une destruction protéolytique et une perte d'activité insecticide des protéines Cry, ces effets pouvant être partiels ou totaux.

L'introduction d'au moins un site de coupure par la pepsine est réalisée de manière artificielle par ingénierie génétique. En particulier, il s'agit d'une insertion ou d'une substitution de résidus acide aminés. De préférence, il s'agit d'une substitution. Une telle substitution peut aisément être réalisée par la technique de mutagenèse dirigée bien connue de l'homme du métier.

De manière préférée, la protéine Cry auquel s'applique le procédé selon l'invention est sélectionnée parmi les protéines Cry1, Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry16, Cry17, Cry19, ou Cry20. De manière préférentielle, il s'agit de la protéine Cry9C, et de préférence la protéine Cry9Ca1.

En particulier, le site de coupure par la pepsine additionnel est représenté par un résidu acide aminé choisi parmi les résidus leucine, phénylalanine ou acide glutamique.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce qu'au moins un site de coupure par la pepsine additionnel est introduit dans au moins une des boucles inter-hélices alpha du domaine I de ladite protéine Cry.

Selon un autre mode particulier de réalisation de l'invention, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce qu'au moins un site de coupure par la pepsine additionnel est introduit dans la boucle inter-hélices alpha reliant les hélices alpha 3 et 4 du domaine I.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le présent procédé s'applique à une protéine Cry9C. De préférence, il s'applique à une protéine Cry9Ca1, et le site de coupure par la pepsine additionnel est introduit par substitution du résidu acide aminé 164. En particulier, le

ter de p...
résidu arginine naturellement présent en position 164 sur la protéine Cry9Ca1 est remplacé par un résidu acide aminé choisi parmi les résidus leucine, phénylalanine ou acide glutamique.

La présente invention concerne également un procédé d'augmentation de la sensibilité à la pepsine des protéines Cry, caractérisé en ce que les sites de coupure par la pepsine additionnels sont introduits par substitution de résidus acide aspartique par des résidus acide glutamique, substitution de résidus tryptophane par des résidus phénylalanine, et substitution de résidus valine ou isoleucine par des résidus leucine.

De manière préférée, le taux de substitution introduit dans ladite protéine Cry est de 25 %.

La présente invention concerne également un polynucléotide codant pour une protéine Cry modifiée selon l'invention. Selon la présente invention, on entend par "polynucléotide" une séquence nucléotidique naturelle ou artificielle pouvant être de type ADN ou ARN, de préférence de type ADN, notamment double brin.

La présente invention concerne également un gène chimère comprenant au moins, liés entre eux de manière opérationnelle, un promoteur fonctionnel dans un organisme hôte, un polynucléotide codant pour une protéine Cry modifiée selon l'invention, et un élément terminateur fonctionnel dans ce même organisme hôte. Les différents éléments qu'un gène chimère peut contenir sont, d'une part, des éléments régulateurs de la transcription, de la traduction et de la maturation des protéines, tels qu'un promoteur, une séquence codant pour un peptide signal ou un peptide de transit, ou un élément terminateur constituant un signal de polyadénylation, et d'autre part un polynucléotide codant pour une protéine. L'expression "liés entre eux de manière opérationnelle" signifie que lesdits éléments du gène chimère sont liés entre eux de manière à ce que le fonctionnement d'un de ces éléments est affecté par celui d'un autre. A titre d'exemple, un promoteur est lié de manière opérationnelle à une séquence codante lorsqu'il est capable d'affecter l'expression de ladite séquence codante. La construction du gène chimère selon l'invention et l'assemblage de ses différents éléments est réalisable par l'emploi de techniques bien connues de l'homme du métier, notamment celles décrites dans Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Nolan C. ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press). Le choix des éléments régulateurs constituant le gène chimère est essentiellement fonction de l'espèce hôte dans laquelle ils doivent fonctionner, et l'homme du métier est capable de sélectionner des éléments régulateurs fonctionnels dans un organisme hôte donné. Par "fonctionnels", on entend capables de fonctionner dans un organisme hôte donné.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, le gène chimère contient un promoteur dit "constitutif". Un promoteur constitutif selon la présente invention est un promoteur qui induit l'expression d'une séquence codante dans tous les tissus d'un organisme hôte et en permanence, c'est-à-dire durant toute la durée du cycle vital dudit organisme hôte. Certains de ces promoteurs peuvent être tissu-spécifiques, c'est-à-dire exprimer la séquence codante en permanence, mais uniquement dans un tissu particulier de l'organisme hôte. Des promoteurs constitutifs peuvent provenir de tout type d'organisme. Parmi les promoteurs constitutifs qui peuvent être utilisés dans le gène chimère de la présente invention, nous pouvons citer à titre d'exemple, des promoteurs bactériens, comme celui du gène de l'octopine synthase ou celui du gène de la nopaline synthase, des promoteurs viraux, comme celui du gène contrôlant la transcription des ARN19S ou 35S du virus de la mosaïque du Choux-Fleur (Odell et al., 1985, Nature, 313, 810-812), ou les promoteurs du virus de la mosaïque de la nervure du Manioc (tels que décrits dans la demande de brevet WO 97/48819). Parmi les promoteurs d'origine végétale on citera le promoteur du gène de la petite sous-unité de ribulose-biscarboxylase/oxygénase (RuBisCO), le promoteur d'un gène d'histone tel que décrit dans la demande EP 0 507 698, le promoteur du gène EF1-alpha (WO 90/02172), le promoteur d'un gène d'actine (US 5,641,876), ou le promoteur d'un gène d'ubiquitine (EP 0342926).

Selon un autre mode particulier de réalisation de l'invention, le gène chimère contient un promoteur inductible. Un promoteur inductible est un promoteur qui ne fonctionne, c'est-à-dire qui n'induit l'expression d'une séquence codante, que lorsqu'il est lui-même induit par un agent inducteur. Cet agent inducteur est en général une substance qui peut être synthétisée dans l'organisme hôte suite à un stimulus externe audit organisme, ce stimulus externe pouvant être de nature physique ou chimique, biotique ou abiotique. De tels promoteurs sont connus, comme par exemple le promoteur du gène d'O-méthyltransférase de classe II (COMT II) de plante décrit dans la demande de brevet WO 00/56897, le promoteur PR-1 d'*Arabidopsis* (Lebel et al., 1998, Plant J. 16(2):223-233), le promoteur EAS4 du gène de la sesquiterpène synthase du Tabac (Yin et al., 1997, Plant Physiol. 115(2), 437-451), ou le promoteur du gène codant la 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (Nelson et al., 1994, Plant Mol. Biol. 25(3):401-412).

Parmi les éléments terminateurs pouvant être utilisés dans le gène chimère de la présente invention, nous pouvons citer à titre d'exemple l'élément terminateur *nos* du gène codant la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* (Bevan et al., 1983, Nucleic Acids Res. 11(2), 369-385), ou l'élément terminateur d'un gène d'histone tel que décrit dans la demande EP 0 633 317.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, le promoteur et l'élément terminateur du gène chimère selon l'invention sont tous les deux fonctionnels dans les plantes.

Il apparaît également important que le gène chimère comprenne aussi un peptide signal ou un peptide de transit qui permet de contrôler et d'orienter la production de la protéine Cry de manière spécifique dans un compartiment cellulaire de l'organisme hôte, comme par exemple le cytoplasme, un compartiment particulier du cytoplasme, la membrane cellulaire, ou dans le cas des plantes dans un type particulier de compartiments cellulaires, par exemple les chloroplastes, ou dans la matrice extracellulaire.

Les peptides de transit peuvent être soit simples, soit doubles. Les peptides de transit doubles sont éventuellement séparés par une séquence intermédiaire, c'est-à-dire qu'ils comprennent, dans le sens de la transcription, une séquence codant pour un peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, une partie de séquence de la partie mature N-terminale d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, puis une séquence codant pour un second peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale. De tels peptides de transit doubles sont par exemple décrits dans la demande de brevet EP 0 508 909.

Comme peptide signal utile selon l'invention, on peut citer en particulier le peptide signal du gène PR-1 α du tabac décrit par Cornelissen et al. (1987, Nucleic Acid Res. 15, 6799-6811) en particulier lorsque le gène chimère selon l'invention est introduit dans des cellules végétales ou des plantes.

La présente invention concerne également un vecteur contenant un gène chimère selon l'invention. Un tel vecteur est utile pour transformer un organisme hôte et exprimer dans celui-ci une protéine Cry modifiée selon l'invention. Ce vecteur peut être un plasmide, un cosmide, un bactériophage ou un virus. De manière générale, les principales qualités de ce vecteur doivent être une capacité à se maintenir et à s'autorépliquer dans les cellules de l'organisme hôte, notamment grâce à la présence d'une origine de répllication, et à y exprimer une protéine Cry modifiée. Le choix d'un tel vecteur ainsi que les techniques d'insertion dans celui-ci du gène chimère selon l'invention sont largement décrits dans Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Nolan C. ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press) et font partie des connaissances générales de l'homme du métier. Le vecteur utilisé dans la présente

l'invention peut également contenir, en plus du gène chimère de l'invention, un gène chimère contenant un marqueur de sélection. Ce marqueur de sélection permet de sélectionner les organismes hôtes effectivement transformés, c'est-à-dire ceux ayant incorporé le vecteur. Parmi les marqueurs de sélection utilisables dans de nombreux organismes hôtes, on peut citer des marqueurs contenant des gènes de résistance aux antibiotiques tel que celui du gène de l'hygromycine phosphotransférase (Gritz et al., 1983, Gene 25:179-188). De manière préférentielle, l'organisme hôte à transformer est une plante. Parmi les marqueurs de sélection utilisables dans les plantes, on peut citer des marqueurs contenant des gènes de tolérance aux herbicides tel que le gène *bar* (White et al., NAR 18:1062, 1990) pour la tolérance au bialaphos, le gène EPSPS (US 5,188,642) pour la tolérance au glyphosate ou encore le gène HPPD (WO 96/38567) pour la tolérance aux isoxazoles. On peut également citer des gènes codant pour des enzymes facilement identifiables comme l'enzyme GUS, des gènes codant pour des pigments ou des enzymes régulant la production de pigments dans les cellules transformées. De tels gènes marqueurs de sélection sont notamment décrits dans les demandes de brevet WO 91/02071 et WO 95/06128.

La présente invention concerne également des organismes hôtes transformés par un vecteur tel que décrit ci-dessus. Par organismes hôtes, on entend tout type d'organismes, en particulier des plantes ou des microorganismes tels que les bactéries, les virus, les champignons ou les levures. On entend par "organisme hôte transformé", un organisme hôte qui a incorporé dans son génome le gène chimère de l'invention, et produit en conséquence une protéine Cry modifiée selon l'invention dans ses tissus. Pour obtenir les organismes hôtes selon l'invention, l'homme du métier peut utiliser une des nombreuses méthodes de transformation connues. Une de ces méthodes consiste à mettre les cellules à transformer en présence de polyéthylène glycol (PEG) et des vecteurs de l'invention (Chang and Cohen, 1979, Mol. Gen. Genet. 168(1), 111-115; Mercenier and Chassy, 1988, Biochimie 70(4), 503-517). L'électroporation est une autre méthode qui consiste à soumettre les cellules ou tissus à transformer et les vecteurs de l'invention à un champ électrique (Andreason and Evans, 1988, Biotechniques 6(7), 650-660; Shigekawa and Dower, 1989, Aust. J. Biotechnol. 3(1), 56-62). Une autre méthode consiste à directement injecter les vecteurs dans les cellules ou les tissus hôtes par micro-injection (Gordon and Ruddle, 1985, Gene 33(2), 121-136). De manière avantageuse, la méthode dite de "biolistique" pourra être utilisée. Elle consiste à bombarder des cellules ou des tissus avec des particules sur lesquelles sont adsorbés les vecteurs de l'invention (Bruce et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86(24), 9692-9696; Klein et al., 1992, Biotechnology 10(3), 286-291; US Patent No. 4,945,050). De manière préférentielle, la transformation de plantes se fera à l'aide de bactéries du

genre *Agrobacterium*, de préférence par infection des cellules ou tissus desdites plantes par *A. tumefaciens* (Knopf, 1979, Subcell. Biochem. 6, 143-173; Shaw et al., 1983, Gene 23(3):315-330) ou *A. rhizogenes* (Bevan et Chilton, 1982, Annu. Rev. Genet. 16:357-384; Tepfer and Casse-Delbart, 1987, Microbiol. Sci. 4(1), 24-28). De manière préférentielle, la transformation de cellules végétales par *Agrobacterium tumefaciens* est réalisée selon le protocole décrit par Ishida et al. (1996, Nat. Biotechnol. 14(6), 745-750).

Ces différentes techniques sont notamment décrites dans les brevets et demandes de brevets suivants : US 4,459,355, US 4,536,475, US 5,464,763, US 5,177,010, US 5,187,073, EP 267,159, EP 604 662, EP 672 752, US 4,945,050, US 5,036,006, US 5,100,792, US 5,371,014, US 5,478,744, US 5,179,022, US 5,565,346, US 5,484,956, US 5,508,468, US 5,538,877, US 5,554,798, US 5,489,520, US 5,510,318, US 5,204,253, US 5,405,765, EP 270 615, EP 442 174, EP 486 233, EP 486 234, EP 539 563, EP 674 725, WO 91/02071 et WO 95/06128.

La présente invention concerne également un procédé de production des protéines Cry modifiées selon l'invention. Ce procédé comprend au moins les étapes de:

- (a) mise en culture d'un organisme hôte transformé selon l'invention dans un milieu de culture adapté à la croissance et à la multiplication dudit organisme
- (b) extraction des protéines Cry produites par l'organisme transformé cultivé à l'étape (a)

Selon l'organisme hôte choisi pour mettre en œuvre ce procédé et selon le gène chimère qu'il contient, les protéines Cry produites sont soit produites dans l'organisme hôte, soit sécrétées dans le milieu de culture. Il s'ensuit que l'extraction prévue à l'étape (b) peut nécessiter une étape de destruction des microorganismes, ou au moins des cellules les composant, afin de libérer les protéines Cry si celles-ci ne sont pas sécrétées dans le milieu de culture. L'étape d'extraction commune aux deux possibilités (protéines sécrétées ou non) consiste en une élimination des organismes hôtes ou débris de ces organismes par filtration ou centrifugation du milieu de culture.

Selon un mode de réalisation particulier, ce procédé de production des protéines Cry modifiées peut également comprendre une étape supplémentaire (c) de purification des protéines Cry produites à partir du milieu de culture.

Selon un mode de réalisation préféré, l'organisme hôte est un microorganisme. De manière préférentielle, l'organisme hôte est une bactérie *Bacillus thuringiensis* et la culture mise en œuvre à l'étape (a) est poursuivie jusqu'à la phase de sporulation desdites bactéries.

La présente invention comprend également des plantes transformées avec un vecteur selon l'invention, caractérisées en ce qu'elles contiennent un gène chimère selon l'invention intégré de manière stable dans leur génome, et expriment une protéine Cry modifiée dans leurs tissus. L'invention s'étend également aux parties de ces plantes, et la descendance de ces plantes. On entend par "partie de ces plantes", tout organe de ces plantes, qu'il soit aérien ou souterrain. Les organes aériens sont les tiges, les feuilles, les fleurs. Les organes souterrains sont principalement les racines, mais ils peuvent également être des tubercules. Par "descendance", on entend principalement les graines contenant les embryons issus de la reproduction de ces plantes entre-elles. Par extension, le terme "descendance" s'applique à toutes les plantes et graines formées à chaque nouvelle génération issues de croisements entre une plante, en particulier une variété végétale, et une plante transformée selon l'invention.

Les plantes transformées selon l'invention peuvent être des monocotylédones ou des dicotylédones. De préférence, ces plantes sont des plantes d'intérêt agronomique. De manière avantageuse, les plantes monocotylédones sont le blé, le maïs, le riz. De manière avantageuse, les plantes dicotylédones sont le colza, le soja, le tabac, le coton.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, les plantes transformées selon l'invention contiennent, en plus d'un gène chimère selon l'invention, au moins un autre gène contenant un polynucléotide codant pour une protéine d'intérêt. Parmi les polynucléotides codant pour une protéine d'intérêt, on peut citer des polynucléotides codant une enzyme de résistance à un herbicide, par exemple le polynucléotide codant pour l'enzyme *bar* (White et al., NAR 18:1062, 1990) pour la tolérance au bialaphos, le polynucléotide codant pour l'enzyme EPSPS (US 5,188,642; WO 97/04103) pour la tolérance au glyphosate ou encore le polynucléotide codant pour l'enzyme HPPD (WO 96/38567) pour la tolérance aux isoxazoles. Peuvent également être contenus dans ces plantes des polynucléotides de résistance aux maladies, par exemple un polynucléotide codant pour l'enzyme oxalate oxydase tel que décrit dans la demande de brevet EP 0 531 498 ou le brevet US 5,866,778, ou un polynucléotide codant pour un peptide antibactérien et/ou antifongique tels que ceux décrits dans les demandes de brevets WO 97/30082, WO 99/24594, WO 99/02717, WO 99/53053, et WO99/91089. On peut également citer des polynucléotides codant pour des caractères agronomiques de la plante, en

particulier un polynucléotide codant pour une enzyme delta-6 désaturase tel que décrit dans les brevets US 5,552,306, US 5,614,313, et demandes de brevets WO 98/46763 et WO 98/46764, ou un polynucléotide codant pour une enzyme sérine acétyltransférase (SAT) tel que décrit dans les demandes de brevets WO 00/01833 et PCT/FR 99/03179. Les plantes transformées selon l'invention peuvent également contenir un polynucléotide codant pour une autre toxine insecticide, par exemple un polynucléotide codant pour une autre protéine Cry de *Bacillus thuringiensis* (pour exemple, voir la demande de brevet internationale WO 98/40490).

La présente invention a également pour objet des anticorps monoclonaux ou polyclonaux dirigés contre une protéine Cry modifiée selon l'invention, ou un fragment de celle-ci. Les techniques de production d'anticorps sont largement décrites dans la littérature générale et dans des ouvrages de référence tels que *Immunological Techniques Made Easy* (1998, O. Cochet, J.-L. Teillaud, C. Sautès eds, John Wiley & Sons, Chichester). De préférence, les anticorps selon l'invention sont mis en œuvre dans des tests, ou kits, de détection des protéines Cry selon l'invention.

Les exemples ci-après permettent d'illustrer la présente invention, sans toutefois en limiter la portée.

Exemple 1 : Création d'un site de coupure par la pepsine au niveau de l'acide aminé 164 de la toxine Cry9Ca1

L'introduction d'un site spécifique à la pepsine dans la toxine Cry9Ca1 de *Bacillus thuringiensis* est réalisée par substitution de l'arginine naturellement présente en position 164 chez cette toxine par l'un des trois acides aminés reconnus par la pepsine : leucine, phénylalanine ou acide glutamique. L'acide aminé 164 est présent au niveau de la boucle inter-hélices alpha reliant les hélices alpha 3 et alpha 4 du domaine I (ci-après boucle inter-hélice alpha3-alpha4).

La séquence native de la boucle inter-hélice alpha3-alpha4 est comprise entre l'acide aspartique 159 et la valine 168. La séquence de cette boucle est la suivante : DRNDTRNLSV. Cette séquence d'acides aminés correspond à la séquence ADN suivante s'étendant de la base 475 à la base 504 :

GAT CGA AAT GAT ACA CGA AAT TTA AGT GTT
Asp Arg Asn Asp Thr Arg Asn Leu Ser Val

Le codon 164 (CGA) codant pour l'arginine est modifié en codon codant soit pour la leucine, soit pour la phénylalanine ou soit pour l'acide glutamique. Les possibilités de codons sont les suivantes :

Leucine : TTA, TTG, CTT, CTC, CTA ou CTG

Phénylalanine : TTT ou TTC

Acide Glutamique : GAA ou GAG

Le choix des codons préférentiels lors de la mutagenèse dirigée dépend de l'organisme dans lequel le gène *cry* modifié doit être exprimé et varie donc en conséquence. Ce choix fait partie des connaissances générales de l'homme du métier qui adaptera les codons préférentiels en fonction de l'organisme de production choisi. Dans cet exemple, l'organisme d'expression choisi est la bactérie *B. thuringiensis*. Les codons préférentiellement utilisés par *B. thuringiensis* pour coder la leucine, la phénylalanine ou l'acide glutamique sont, respectivement, TTA (leucine), TTT (phénylalanine) et GAA (acide glutamique).

La modification pour expression chez *Bt* peut donc être réalisée en utilisant les oligonucléotides de mutagenèses suivants (dans les oligonucléotides décrits dans les exemples ci-après, le codon en lettres majuscules correspond au codon muté, et les bases et acides aminés en caractères gras correspondent aux bases et acides aminés spécifiquement mutés):

Oligonucléotide n° 1 : 5' - gat cga aat gat aca **TTA** aat tta agt gtt gtt - 3'
Asp Arg Asn Asp Thr **Leu** Asn Leu Ser Val Val

L'oligonucléotide n°1 permet le remplacement de l'arginine 164 par une leucine

Oligonucléotide n° 2 : 5' - gat cga aat gat aca **TTT** aat tta agt gtt gtt - 3'
Asp Arg Asn Asp Thr **Phe** Asn Leu Ser Val Val

L'oligonucléotide n°2 permet le remplacement de l'arginine 164 par une phénylalanine

Oligonucléotide n° 3 : 5' - gat cga aat gat aca **GAA** aat tta agt gtt gtt - 3'
Asp Arg Asn Asp Thr **Glu** Asn Leu Ser Val Val

L'oligonucléotide n°3 permet le remplacement de l'arginine 164 par un acide glutamique

Les caractéristiques des souches bactériennes de *Escherichia coli* utilisées pour la modification de la séquence du gène *cry9Ca1* sont les suivantes :

- JM 109 de génotype *recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thiD (lac-proAB) F'* (*traD36 proAB⁺ lacI_q lacZ DM15*)
- BMH 71-18 mut S de génotype *thi, supE, Δ(lac-proAB), (mutS::Tn10)(F', proAB, lacI_qΔM15)*.

L'ADN plasmidique est préparé par minipréparation selon la technique de la lyse alcaline (Birboim and Doly, 1979). Chaque colonie bactérienne est cultivée dans 2 ml de milieu LB additionné de l'antibiotique approprié pendant une nuit à 37 °C avec agitation (200 rpm). La culture est ensuite transférée dans un microtube puis centrifugée à 13500 g pendant 5 min. Après élimination du surnageant, les bactéries sont resuspendues dans 100µl d'une solution de 25mM Tris-HCl, pH 8, 10mM EDTA contenant de la Rnase A à la concentration finale de 100 µg/ml. 200 µl d'une solution de NaOH 0,2M, 1% SDS sont rajoutés et la suspension est mélangée deux fois par inversion du microtube. 150 µl d'une solution d'acétate de potassium 2,55 M, pH 4,5 sont rajoutés et la suspension est incubée 5 min dans la glace. Après une centrifugation de 15 min à 13500 g, le surnageant est transféré dans un microtube contenant 1 ml d'éthanol froid. Après une centrifugation de 30 min à 13500 g, le surnageant est éliminé et le culot lavé avec 1 ml d'éthanol 70%. Le culot contenant l'ADN est séché quelques minutes sous vide puis repris dans 50 µl d'eau distillée stérile. Les échantillons sont ensuite placés à 65°C pendant 30 min.

Les digestions par endonucléases de restriction sont réalisées pour 1 µg d'ADN dans un volume final de 20 µl en présence d'un dixième de volume final de tampon 10X conseillé par le fournisseur pour chaque enzyme et à l'aide de 5 unités d'enzyme. La réaction est incubée pendant 2 à 3 h à la température optimale pour l'enzyme.

La déphosphorylation des extrémités 5' engendrées par une enzyme de restriction est réalisée avec la phosphatase alcaline d'intestin de veau. La réaction se fait en utilisant 5 µl de tampon de déphosphorylation 10X (500 mM Tris-HCl, pH 9,3, 10 mM MgCl₂, 1mM ZnCl₂, 10 mM spermidine) et une unité d'enzyme par µg d'ADN dans un volume final de 50 µl. La réaction est incubée pendant une heure à 37°C dans le cas d'extrémités 5' sortantes ou à 55°C dans le cas d'extrémités franches ou 3' sortantes. Après la déphosphorylation, l'enzyme est ensuite inactivée pendant 30 min à 65°C puis éliminée avec deux extractions volume à volume avec un mélange de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25-24-1). Les ligatures se font à l'aide de l'ADN ligase du phage T4. Elles sont réalisées avec une quantité de vecteur égale à 100 ng et un rapport molaire insert/vecteur compris entre 5 et 10. Le volume final de la réaction est de 30 µl et

comprend 3 µl de tampon de ligature 10X (300 mM Tris-HCl, pH 7,8, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM ATP) et 3 unités d'enzyme. La réaction est incubée une nuit à 14°C.

Les oligonucléotides de mutagenèse (oligonucléotide n°1, oligonucléotide n°2 et oligonucléotide n°3) sont phosphorylés en 5' afin de permettre la ligature. 100 pmoles d'oligonucléotide sont incubés 30 min à 37°C avec 5 unités de T4 polynucléotide kinase dans un volume final de 25 µl en présence de 2,5 µl de tampon 10X de phosphorylation (700 mM Tris-HCl, pH 7,6, 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT) en présence d'ATP à la concentration finale de 1mM. L'enzyme est ensuite inactivée à 70°C pendant 10 min.

La mutagenèse dirigée est conduite selon une méthode classique décrite ci-après. D'autres procédures connues des experts de l'art sont décrites dans la littérature et donnent des résultats identiques. La méthode de mutagenèse dirigée utilisée est celle décrite par le fabricant pour l'usage du système Altered Sites II commercialisé par la société Promega. Une description détaillée du système de mutagenèse et du protocole peut être trouvée sur le site internet de la société Promega à l'adresse <http://www.promega.com>. Le gène *cry9Ca1* est préalablement cloné dans un phagémide pAlter-1 (Promega) portant le gène de résistance à la tétracycline et le gène de résistance à l'ampicilline contenant une mutation ponctuelle. Le fragment d'ADN à muter est au préalable cloné dans le plasmide pAlter-1. 0.5 pmol d'ADN plasmidique sont dénaturés en rajoutant 2 µl de NaOH 2M, 2 mM EDTA dans un volume final de 20 µl et en incubant 5 min à température ambiante. 2 µl d'acétate d'ammonium 2M, pH 4,6 et 75 µl d'éthanol sont rajoutés et le mélange est incubé à -70°C pendant 30 min. Après une centrifugation à 14000 g pendant 15 min à 4°C, le culot est ensuite rincé avec 200 µl d'éthanol 70% et recentrifugé à 14000 g pendant 15 min à 4°C. Le culot d'ADN dénaturé est alors séché sous vide et resuspendu dans 100 µl d'eau distillée stérile. 10 µl d'ADN dénaturé c'est-à-dire 0,05 pmol sont mélangés avec 0.25 pmol d'oligonucléotide de réparation du gène de résistance à l'ampicilline phosphorylé, 0.25 pmol d'oligonucléotide de destruction du gène de résistance à la tétracycline et 1.25 pmol d'oligonucléotide de mutagenèse (oligonucléotide n°1, n°2 ou n°3) phosphorylé en présence de tampon d'hybridation (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl) et incubés à 75°C pendant 5 min puis refroidis lentement jusqu'à température ambiante. 5 µl d'eau distillée stérile, 3 µl de tampon de synthèse 10x (100 mM Tris-HCl, pH7,5, 20 mM DTT, 10 mM ATP, 5mM dNTP), 10 unités d'ADN polymérase T4 et 3 unités d'ADN ligase T4 sont rajoutés et la réaction est incubée 90 min à 37°C. 200 µl de bactéries compétentes *E. coli* BMH 71-18 sont alors incubées en présence de 1,5 µl de la réaction précédente dans de la glace pendant 30 min. Un choc thermique est ensuite effectué en plaçant les bactéries 50 sec à 42°C puis 2 min dans la glace. 900 µl de milieu LB sont ensuite rajoutés et la suspension est incubée à 37°C pendant

une heure sous agitation. 4 ml de milieu LB additionné d'ampicilline à la concentration finale de 100 µg/ml sont alors rajoutés et la culture est incubée une nuit à 37°C sous agitation. Une minipréparation d'ADN plasmidique est réalisée à partir des 4 ml de culture selon le protocole d'extraction d'ADN plasmidique décrit précédemment. 200 µl de bactéries compétentes *E. coli* JM109 sont alors incubées en présence de 1 ng d'ADN plasmidique dans de la glace pendant 30 min. Un choc thermique est ensuite effectué en plaçant les bactéries 50 sec. à 42°C puis 2 min. dans la glace. 900 µl de milieu LB sont ensuite rajoutés et la suspension est incubée à 37°C pendant une heure sous agitation. 100 µl de suspension bactérienne sont ensuite étalés sur une boîte de Pétri contenant du milieu LB solide additionné d'ampicilline à la concentration finale de 100 µg/ml. Les recombinants obtenus sont criblés pour trouver le clone d'intérêt. Cette recherche est effectuée en isolant l'ADN plasmidique de plusieurs colonies par la technique de minipréparation décrite précédemment puis par séquençage de cet ADN. La sélection des recombinants se fait alors à l'aide de milieu additionné de tétracycline à la concentration finale de 12,5 µg/ml. La justesse de la mutation souhaitée et la vérification de l'absence de mutations indésirables sont contrôlées par séquençage de l'ADN après mutagenèse dirigée. Des échantillons d'ADN pour le séquençage sont purifiés avec le Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) selon la procédure recommandée par le fournisseur et le séquençage est réalisé sur un séquenceur automatique ABI 377 (Perkin-Elmer) à partir de réactions de séquençage conduite selon la méthode de terminaison de chaîne (Sanger *et al.*, 1977), par PCR en utilisant le système ABI PRISM BigDye terminator Cycle Sequencing Kit. Pour la réalisation des réactions de séquençage et l'analyse automatique des échantillons, les procédures utilisées sont celles recommandées par le fournisseur (Applied Biosystems).

Exemple 2 : Création de sites de coupure par la pepsine au niveau de la boucle inter-hélice alpha 3-alpha 4 de la toxine Cry9Ca1

L'introduction de sites spécifiques à la pepsine dans la boucle inter-hélice alpha3-alpha4 de la toxine Cry9Ca1 est réalisée par substitution d'au moins un acide aminé de cette boucle inter-hélice par un acide aminé reconnu par la pepsine, à savoir la leucine, la phénylalanine et l'acide glutamique. Des codons codant pour ces trois acides aminés seront donc créés en place des codons naturellement présents dans la région s'étendant de la base 475 à la base 504. Les possibilités de codons pour ces trois acides aminés sont décrites dans l'Exemple 1.

Comme dans l'Exemple 1, l'organisme de production de la protéine Cry modifiée choisi est la bactérie *B. thuringiensis*, et le choix des codons de remplacement est donc identique à celui de l'Exemple 1. En outre, si un autre organisme de production est choisi, l'homme du métier

saura adapter les codons préférentiels en fonction de l'organisme de production choisi.

Diverses séquences alternatives pour la boucle inter-hélice alpha 3-alpha 4 sont possibles, chacune possédant un nombre variable de résidus leucine, phénylalanine ou acide glutamique. Certaines de ces possibilités sont présentées dans le tableau 1. Les possibilités de modification de la boucle inter-hélice alpha 3-alpha 4 ne sont pas limitées à celles présentées dans le tableau 1 ci-dessous. La liste présentée dans le tableau 1 a pour objectif d'illustrer certaines des possibilités de modification sans limiter la portée de l'invention à ces illustrations. L'homme du métier connaissant les codons spécifiques de chaque acide aminés selon les organismes saura adapter l'enseignement décrit dans cet exemple à toutes les possibilités de modifications de la boucle inter-hélice alpha3-alpha4, en particulier à celles qui ne sont pas décrites dans le tableau 1.

Tableau 1. Exemples de modifications possibles de la boucle inter-hélice alpha 3-alpha 4 de la toxine Cry9Ca1

Protéine	Séquence en acides aminés	Séquence nucléotidique
Cry9Ca1	DRNDTRNLSV	gat cga aat gat aca cga aat tta agt gtt Asp Arg Asn Asp Thr Arg Asn Leu Ser Val
Mutant n° 1	ELNEFLNLSV	gaA TTa aat gaA TTT TTa aat tta agt gtt Glu Leu Asn Glu Phe Leu Asn Leu Ser Val
Mutant n° 2	ELNELLNLSV	gaA TTa aat gaA TTa TTa aat tta agt gtt Glu Leu Asn Glu Leu Leu Asn Leu Ser Val
Mutant n° 3	ELLEFLLLSV	gaA TTa TTA gaA TTT TTa TTA tta agt gtt Glu Leu Leu Glu Phe Leu Leu Leu Ser Val
Mutant n° 4	ELLELLLSV	gaA TTa TTA gaA TTa TTa TTA tta agt gtt Glu Leu Leu Glu Leu Leu Leu Leu Ser Val
Mutant n° 5	ELLEELLLSV	gaA TTa TTA gaA GAa TTa TTA tta agt gtt Glu Leu Leu Glu Glu Leu Leu Leu Ser Val
Mutant n° 6	ERLEFLLLSV	gaA cga TTA gaA TTT TTa TTA tta agt gtt Glu Arg Leu Glu Phe Leu Leu Leu Ser Val
Mutant n° 7	ERLELLLSV	gaA cga TTA gaA TTa TTa TTA tta agt gtt Glu Arg Leu Glu Leu Leu Leu Leu Ser Val
Mutant n° 8	ERLEEELLSV	gaA TTa GAA gaA TTa TTa TTA tta agt gtt Glu Leu Glu Glu Leu Leu Leu Leu Ser Val
Mutant n° 9	ELLEEELSV	gaA TTa TTA gaA GAa GAa GAA tta agt gtt Glu Leu Leu Glu Glu Glu Glu Leu Ser Val

La substitution de plusieurs acides aminés au sein de la boucle inter-hélice alpha3-alpha 4 nécessite pour chacun des mutants l'utilisation successive de plusieurs oligonucléotides de mutagenèse. Les oligonucléotides de mutagenèse nécessaires à la création des exemples de mutants présentés dans le tableau 1 sont présentés ci-après (numérotés de 4 à 20).

Oligonucléotide n° 4 :	cga aat gat aca cga TTA tta agt gtt gtt cgt Arg Asn Asp Thr Arg Leu Leu Ser Val Val Arg
Oligonucléotide n° 5 :	cga aat gat aca cga GAA tta agt gtt gtt cgt Arg Asn Asp Thr Arg Glu Leu Ser Val Val Arg
Oligonucléotide n° 6 :	ttg gct gat cga aat ga A TTT TTa aat tta agt gtt gtt Leu Ala Asp Arg Asn Glu Phe Leu Asn Leu Ser Val Val
Oligonucléotide n° 7 :	ttg gct gat cga aat ga A TTT TTa tta tta agt gtt gtt Leu Ala Asp Arg Asn Glu Phe Leu Leu Leu Ser Val Val
Oligonucléotide n° 8 :	ttg gct gat cga aat ga A TTa TTa aat tta agt gtt gtt Leu Ala Asp Arg Asn Glu Leu Leu Asn Leu Ser Val Val
Oligonucléotide n° 9 :	ttg gct gat cga aat ga A TTa TTa tta tta agt gtt gtt Leu Ala Asp Arg Asn Glu Leu Leu Leu Leu Ser Val Val
Oligonucléotide n° 10 :	ttg gct gat cga aat ga A GAA GAA gaa tta agt gtt gtt Leu Ala Asp Arg Asn Glu Glu Glu Glu Leu Ser Val Val
Oligonucléotide n° 11 :	ttg gct gat cga aat ga A GAA TTa tta tta agt gtt gtt Leu Ala Asp Arg Asn Glu Glu Leu Leu Leu Ser Val Val
Oligonucléotide n° 12 :	caa aat tgg ttg gct ga A TTa aat gaa tta tta aat Gln Asn Trp Leu Ala Glu Leu Asn Glu Leu Leu Asn
Oligonucléotide n° 13 :	caa aat tgg ttg gct ga A TTa aat gaa ttt tta aat Gln Asn Trp Leu Ala Glu Leu Asn Glu Phe Leu Asn
Oligonucléotide n° 14 :	caa aat tgg ttg gct ga A TTa TTA gaa ttt tta tta tta Gln Asn Trp Leu Ala Glu Leu Leu Glu Phe Leu Leu Leu
Oligonucléotide n° 15 :	caa aat tgg ttg gct ga A TTa TTA gaa tta tta tta tta Gln Asn Trp Leu Ala Glu Leu Leu Glu Leu Leu Leu Leu
Oligonucléotide n° 16 :	caa aat tgg ttg gct ga A TTa TTA gaa gaa tta tta tta Gln Asn Trp Leu Ala Glu Leu Leu Glu Glu Leu Leu Leu
Oligonucléotide n° 17 :	caa aat tgg ttg gct ga A cga TTA gaa ttt tta tta tta Gln Asn Trp Leu Ala Glu Arg Leu Glu Phe Leu Leu Leu
Oligonucléotide n° 18 :	caa aat tgg ttg gct ga A cga TTA gaa tta tta tta tta Gln Asn Trp Leu Ala Glu Arg Leu Glu Leu Leu Leu Leu
Oligonucléotide n° 19 :	caa aat tgg ttg gct ga A TTa ga A gaa tta tta tta tta Gln Asn Trp Leu Ala Glu Leu Glu Glu Leu Leu Leu Leu
Oligonucléotide n° 20 :	caa aat tgg ttg gct ga A TTa TTA gaa gaa gaa gaa tta Gln Asn Trp Leu Ala Glu Leu Leu Glu Glu Glu Glu Leu

La procédure de mutagenèses dirigées successives est similaire à la procédure décrite dans l'exemple 1. La seule différence réside dans la combinaison des oligonucléotides. Pour chacun des exemples de mutants décrits dans le tableau 1, les combinaisons successives d'oligonucléotides sont décrites ci-après.

Mutant n° 1 : La création du mutant n°1 nécessite deux séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole décrit dans l'exemple 1 en utilisant l'oligonucléotide n°6 lors de la première mutagenèse et l'oligonucléotide n° 13 lors de la seconde. L'oligonucléotide n° 13 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n°6.

Mutant n° 2 : La création du mutant n° 2 nécessite deux séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole décrit dans l'exemple 1 en utilisant l'oligonucléotide n°8 lors de la première mutagenèse et l'oligonucléotide n° 12 lors de la seconde. L'oligonucléotide n° 12 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n°8.

Mutant n° 3 : La création du mutant n° 3 nécessite trois séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole décrit dans l'exemple 1 en utilisant l'oligonucléotide n°4 lors de la première mutagenèse, l'oligonucléotide n° 7 lors de la deuxième et l'oligonucléotide n° 14 lors de la troisième. L'oligonucléotide n° 7 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n°4 et l'oligonucléotide n° 14 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors des deux premières mutagenèses avec les oligonucléotides n° 4 et n° 7.

Mutant n° 4 : La création du mutant n° 4 nécessite trois séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole décrit dans l'exemple 1 en utilisant l'oligonucléotide n°4 lors de la première mutagenèse, l'oligonucléotide n° 9 lors de la deuxième et l'oligonucléotide n° 15 lors de la troisième. L'oligonucléotide n° 9 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n°4 et l'oligonucléotide n° 15 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors des deux premières mutagenèses avec les oligonucléotides n° 4 et n° 9.

Mutant n° 5 : La création du mutant n° 5 nécessite trois séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole décrit dans l'exemple 1 en utilisant l'oligonucléotide n°4 lors de la première mutagenèse, l'oligonucléotide n° 11 lors de la deuxième et l'oligonucléotide n° 16 lors de la troisième. L'oligonucléotide n° 11 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n°4 et l'oligonucléotide n° 16 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors des deux premières mutagenèses avec les oligonucléotides n° 4 et n° 11.

Mutant n° 6 : La création du mutant n° 6 nécessite trois séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole décrit dans l'exemple 1 en utilisant l'oligonucléotide n°4 lors de la première mutagenèse, l'oligonucléotide n° 7 lors de la deuxième et l'oligonucléotide n° 17 lors de la troisième. L'oligonucléotide n° 7 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n°4 et l'oligonucléotide n° 17 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors des deux premières mutagenèses avec les oligonucléotides n° 4 et n° 7.

Mutant n° 7 : La création du mutant n° 7 nécessite trois séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole décrit dans l'exemple 1 en utilisant l'oligonucléotide n°4 lors de la première mutagenèse, l'oligonucléotide n° 9 lors de la deuxième et l'oligonucléotide n° 18 lors de la troisième. L'oligonucléotide n° 9 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n°4 et l'oligonucléotide n° 18 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors des deux premières mutagenèses avec les oligonucléotides n° 4 et n° 9.

Mutant n° 8 : La création du mutant n° 8 nécessite trois séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole décrit dans l'exemple 1 en utilisant l'oligonucléotide n°4 lors de la première mutagenèse, l'oligonucléotide n° 9 lors de la deuxième et l'oligonucléotide n° 19 lors de la troisième. L'oligonucléotide n° 9 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n°4 et l'oligonucléotide n° 19 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors des deux premières mutagenèses avec les oligonucléotides n° 4 et n° 9.

Mutant n° 9 : La création du mutant n° 9 nécessite trois séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole décrit dans l'exemple 1 en utilisant l'oligonucléotide n°5 lors de la première mutagenèse, l'oligonucléotide n° 10 lors de la deuxième et l'oligonucléotide n° 20 lors de la troisième. L'oligonucléotide n° 10 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n°5 et l'oligonucléotide n° 20 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors des deux premières mutagenèses avec les oligonucléotides n° 5 et n° 10.

Selon ce protocole, les oligonucléotides sont répartis en trois catégories, oligonucléotides de 1^{ère} série, oligonucléotides de 2^{ème} série et oligonucléotides de 3^{ème} série. Cette répartition est la suivante :

Oligonucléotides de 1^{ère} série : Oligonucléotides n° 4, 5, 6 et 8

Oligonucléotides de 2^{ème} série : Oligonucléotides n° 7, 9, 10, 11, 12 et 13

Oligonucléotides de 3^{ème} série : Oligonucléotides n° 14, 15, 16, 17, 18, 19 et 20

Le protocole complet de réalisation de ces mutants est identique à celui décrit dans l'Exemple 1. Ce protocole est commun à chacune des séries de mutagenèses, seuls l'oligonucléotide de mutagenèse et l'oligonucléotide d'inhibition/restauration de la résistance à l'antibiotique changent. Le passage à la mutation suivante s'effectue après le criblage du clone d'intérêt ayant intégré la mutation précédente. Si cette étape est la dernière de la première série ou de la deuxième série de mutagenèse, le matériel issu de cette série d'expérimentations est réutilisé comme matériel initial pour respectivement la deuxième ou la troisième série de mutagenèse en utilisant respectivement les oligonucléotides de 2^{ème} ou de 3^{ème} série. Un deuxième cycle de mutagenèse peut alors être effectué en utilisant l'ADN plasmidique obtenu comme ADN matrice ainsi que l'oligonucléotide de réparation du gène de résistance à la tétracycline et l'oligonucléotide de destruction du gène de résistance à l'ampicilline et un oligonucléotide de mutagenèse de 2^{ème} série. La sélection des recombinants se fait alors à l'aide de milieu additionné de tétracycline à la concentration finale de 12,5 µg/ml. Un troisième cycle de mutagenèse peut être réalisé en utilisant l'ADN plasmidique obtenu à l'issue du deuxième cycle de mutagenèse comme ADN matrice ainsi que l'oligonucléotide de réparation du gène de résistance à l'ampicilline et l'oligonucléotide de destruction du gène de résistance à la tétracycline et un oligonucléotide de mutagenèse de 3^{ème} série. La sélection des recombinants se fait alors à l'aide de milieu additionné d'ampicilline à la concentration finale de 100 µg/ml. Après réalisation de toutes les séries de mutagenèse nécessaires à la réalisation d'un mutant, les étapes de contrôles des mutations sont réalisées comme décrites à l'Exemple 1.

Exemple 3 : Création de sites de coupure par la pepsine dans les boucles inter-hélices alpha 4-alpha 5, alpha 5-alpha 6 et alpha 6-alpha 7 de la toxine Cry9Ca1

Les positions des séquences natives des boucles inter-hélices alpha 4-alpha 5, alpha 5-alpha 6 et alpha 6-alpha 7 de la toxine Cry9Ca1 sont présentées dans le tableau 2 ci-après. Les séquences nucléotidiques et les positions correspondantes dans le gène *cry9Ca1* sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 2. Position et séquences des boucles inter-hélices $\alpha 4-\alpha 5$, $\alpha 5-\alpha 6$ et $\alpha 6-\alpha 7$ de la toxine Cry9Ca1

Boucle	Séquence	Position
Boucle $\alpha 4-\alpha 5$	FAVNGQQVPLL	Phénylalanine 187 à Leucine 197
Boucle $\alpha 5-\alpha 6$	LFGEWGF	Leucine 216 à Phénylalanine 223
Boucle $\alpha 6-\alpha 7$	LRGTN	Leucine 257 à Asparagine 261

Tableau 3. Position et séquences du gène *cry9Ca1* codant les boucles inter-hélices $\alpha 4$ - $\alpha 5$, $\alpha 5$ - $\alpha 6$ et $\alpha 6$ - $\alpha 7$

Boucle	Séquence	Position
Boucle $\alpha 4$ - $\alpha 5$	TTT GCA GTA AAT GGA CAG CAG GTT CCA TTA CTG	559 - 591
Boucle $\alpha 5$ - $\alpha 6$	CTT TTT GGA GAA GGA TGG GGA TTC	646 - 669
Boucle $\alpha 6$ - $\alpha 7$	TTA AGA GGA ACA AAT	769- 783

La superposition des séquences nucléotidiques et acides aminés est la suivante :

Boucle $\alpha 4$ - $\alpha 5$:	TTT GCA GTA AAT GGA CAG CAG GTT CCA TTA CTG Phe Ala Val Asn Gly Gln Gln Val Pro Leu leu
Boucle $\alpha 5$ - $\alpha 6$	CTT TTT GGA GAA GGA TGG GGA TTC Leu Phe Gly Glu Gly Trp Gly Phe
Boucle $\alpha 6$ - $\alpha 7$	TTA AGA GGA ACA AAT Leu Arg Gly thr Asn

L'introduction de sites spécifiques à la pepsine dans les boucles inter-hélices $\alpha 4$ - $\alpha 5$, $\alpha 5$ - $\alpha 6$ ou $\alpha 6$ - $\alpha 7$ de la toxine Cry9Ca1 est réalisée par substitution d'au moins un acide aminé de ces boucles inter-hélices par un acide aminé reconnu par la pepsine, à savoir la leucine, la phénylalanine et l'acide glutamique. Des codons codant pour ces trois acides aminés seront donc créés en place des codons naturellement présents dans la région s'étendant des bases 559 à 591 (boucle inter-hélice $\alpha 4$ - $\alpha 5$), 646 à 669 (boucle inter-hélice $\alpha 5$ - $\alpha 6$), et 769 à 783 (boucle inter-hélice $\alpha 6$ - $\alpha 7$). Les possibilités de codons pour ces trois acides aminés sont décrites dans l'Exemple 1.

Comme dans l'Exemple 1, l'organisme de production de la protéine Cry modifiée choisi est la bactérie *B. thuringiensis*, et le choix des codons de remplacement est donc identique à celui de l'Exemple 1. En outre, si un autre organisme de production est choisi, l'homme du métier saura adapter les codons préférentiels en fonction de l'organisme de production choisi.

Diverses séquences alternatives pour les boucles inter-hélice $\alpha 4$ - $\alpha 5$, $\alpha 5$ - $\alpha 6$ et $\alpha 6$ - $\alpha 7$ sont possibles, chacune possédant un nombre variable de résidus leucine, phénylalanine ou acide glutamique. Plusieurs de ces diverses possibilités sont présentées dans les tableaux 4, 5 et 6. Les possibilités de modification des boucles inter-hélice $\alpha 4$ - $\alpha 5$, $\alpha 5$ - $\alpha 6$ et $\alpha 6$ - $\alpha 7$ ne sont pas limitées à celles présentées dans les tableaux 4, 5 et 6 ci-dessous. La liste présentée dans les tableaux 4, 5 et 6 a pour objectif d'illustrer certaines des possibilités de modification sans limiter la portée de l'invention à ces illustrations.

L'homme du métier connaissant les codons spécifiques de chaque acide aminé selon les organismes saura adapter l'enseignement décrit dans cet exemple à toutes les possibilités de modifications des boucles inter-hélices alpha4-alpha5, alpha5-alpha6 et alpha6-alpha7, en particulier à celles qui ne sont pas décrites dans les tableaux 4, 5 et 6.

Tableau 4. Exemples de modifications possibles de la boucle inter-hélice alpha 4-alpha 5 de la toxine Cry9Ca1

Protéine	Séquence en acides aminés	Séquence nucléotidique
Cry9Ca1	FAVNGQQVPLL	ttt gca gta aat gga cag cag gtt cca tta ctg Phe Ala Val Asn Gly Gln Gln Val Pro Leu leu
Mutant n° 10	FLLNLFFLPLL	ttt TTa Tta aat TTa TTT TTT TtA cca tta ctg Phe Leu leu Asn Leu Phe Phe Leu Pro Leu leu
Mutant n° 11	FLLNLEELPLL	ttt TTa Tta aat TTa GaA GaA TtA cca tta ctg Phe Leu leu Asn Leu Glu Glu Leu Pro Leu leu
Mutant n° 12	FEENLEELPLL	ttt GAa GAa aat TTa GaA GaA TtA cca tta ctg Phe Glu Glu Asn Leu Glu Glu Leu Pro Leu leu
Mutant n° 13	FEENFLLFPLL	ttt GAa GAa aat TTT TTA TTA Ttt cca tta ctg Phe Glu Glu Asn Phe leu Leu Phe Pro Leu leu
Mutant n° 14	FEENFEEFPLL	ttt GAa GAa aat TTT GaA GaA Ttt cca tta ctg Phe Glu Glu Asn Phe Glu Glu Phe Pro Leu leu
Mutant n° 15	FLLNFEEFPLL	ttt TTa TTa aat TTT GaA GaA Ttt cca tta ctg Phe Leu leu Asn Phe Glu Glu Phe Pro Leu leu
Mutant n° 16	FLLNEFFEPLL	ttt TTa TTa aat GAa TTT TTT gAA cca tta ctg Phe Leu leu Asn Glu Phe Phe Glu Pro Leu leu

Tableau 5. Exemples de modifications possibles de la boucle inter-hélice alpha 5-alpha 6 de la toxine Cry9Ca1

Protéine	Séquence en acides aminés	Séquence nucléotidique
Cry9Ca1	LFGEWGF	ctt ttt gga gaa gga tgg gga ttc Leu Phe Gly Glu Gly Trp Gly Phe
Mutant n° 17	LFLELFLF	ctt ttt TTa gaa TTa tTT TTa ttc Leu Phe Leu Glu Leu Phe Leu Phe
Mutant n° 18	LFLLLFLF	ctt ttt TTa TTa TTa tTT TTa ttc Leu Phe Leu Leu Leu Phe Leu Phe
Mutant n° 19	LFLEEFEL	ctt ttt TTa gaa gAa tTT gAa TTA Leu Phe Leu Glu Glu Phe Glu Leu
Mutant n° 20	LFEEEFEL	ctt ttt gAa gaa gAa tTT gAa TTA Leu Phe Glu Glu Glu Phe Glu Leu

Mutant n° 21 LFEFEFEE ctt ttt gAa gaa TTa tTT gAa GAA
Leu Phe **Glu** Glu Glu Phe Glu Glu

Tableau 6. Exemples de modifications possibles de la boucle inter-hélice alpha 6-alpha 7 de la toxine Cry9Ca1

Protéine	Séquence en acides aminés	Séquence nucléotidique
Cry9Ca1	LRGTN	tta aga gga aca aat Leu Arg Gly thr Asn
Mutant n° 22	LLELN	tta TTa gAa TTa aat Leu Leu Glu Leu Asn
Mutant n° 23	LLFLN	tta TTa TTT TTa aat Leu Leu Phe Leu Asn
Mutant n° 24	LELLN	tta GAa TTa TTa aat Leu Glu Leu Leu Asn
Mutant n° 25	LLFFN	tta TTa TTT TTT aat Leu Leu Phe Phe Asn
Mutant n° 26	LEELN	tta GAa GAa TTa aat Leu Glu Glu Leu Asn
Mutant n° 27	LEFLN	tta GAa TTT TTa aat Leu Glu Phe Leu Asn
Mutant n° 28	LEFEN	tta GAa TTT GAa aat Leu Glu Phe Glu Asn
Mutant n° 29	LEEEN	tta GAa gAa GAa aat Leu Glu Glu Glu Asn

3-1- Création de sites de coupure par la pepsine dans la boucle inter-hélice alpha4-alpha 5

La substitution de plusieurs acides aminés au sein de la boucle inter-hélice alpha4-alpha 5 nécessite pour chacun des mutants l'utilisation successive de plusieurs oligonucléotides de mutagenèse. Les oligonucléotides de mutagenèse nécessaires à la création des exemples de mutants présentés dans le tableau 4 sont présentés ci-après (numérotés de 21 à 34).

Oligonucléotide n° 21 : gct att cca ttg ttt **T**Ta **T**ta aat gga cag cag gtt
Ala Ile Pro Leu Phe **Leu** **leu** Asn Gly Gln Gln Val

Oligonucléotide n° 22 : gct att cca ttg ttt **G**Aa **G**Aa aat gga cag cag gtt
Ala Ile Pro Leu Phe **Glu** **Glu** Asn Gly Gln Gln Val

Oligonucléotide n° 23 : tta tta aat gga cag cag **T**tA cca tta ctg tca gta
Leu Leu Asn Gly Gln Gln **Leu** Pro Leu Leu Ser Val

Oligonucléotide n° 24 :	tta tta aat gga cag cag Ttt cca tta ctg tca gta Leu leu Asn Gly Gln Gln Phe Pro Leu Leu Ser Val
Oligonucléotide n° 25 :	tta tta aat gga cag cag gAA cca tta ctg tca gta Leu leu Asn Gly Gln Gln Glu Pro Leu Leu Ser Val
Oligonucléotide n° 26 :	gaa gaa aat gga cag cag TtA cca tta ctg tca gta Glu Glu Asn Gly Gln Gln Leu Pro Leu Leu Ser Val
Oligonucléotide n° 27 :	gaa gaa aat gga cag cag Ttt cca tta ctg tca gta Glu Glu Asn Gly Gln Gln Phe Pro Leu Leu Ser Val
Oligonucléotide n° 28 :	cca ttg ttt tta tta aat TTa TTT TTT tta cca tta ctg tca gta Pro Leu Phe Leu Leu Asn Leu Phe Phe Leu Pro Leu Leu Ser Val
Oligonucléotide n° 29 :	cca ttg ttt tta tta aat TTa GaA GaA tta cca tta ctg tca gta Pro Leu Phe Leu Leu Asn Leu Glu Glu Leu Pro Leu Leu Ser Val
Oligonucléotide n° 30 :	cca ttg ttt gaa gaa aat TTa GaA GaA tta cca tta ctg tca gta Pro Leu Phe Glu Glu Asn Leu Glu Glu Leu Pro Leu Leu Ser Val
Oligonucléotide n° 31 :	cca ttg ttt gaa gaa aat TTT TTA TTA ttt cca tta ctg tca gta Pro Leu Phe Glu Glu Asn Phe Leu Leu Phe Pro Leu Leu Ser Val
Oligonucléotide n° 32 :	cca ttg ttt gaa gaa aat TTT GaA GaA ttt cca tta ctg tca gta Pro Leu Phe Glu Glu Asn Phe Glu Glu Phe Pro Leu Leu Ser Val
Oligonucléotide n° 33 :	cca ttg ttt tta tta aat TTT GaA GaA ttt cca tta ctg tca gta Pro Leu Phe Leu Leu Asn Phe Glu Glu Phe Pro Leu Leu Ser Val
Oligonucléotide n° 34 :	cca ttg ttt tta tta aat GAa TTT TTT gaa cca tta ctg tca gta Pro Leu Phe Leu Leu Asn Glu Phe Phe Glu Pro Leu Leu Ser Val

La procédure de mutagenèses dirigées successives est similaire à la procédure décrite dans l'exemple 2. La seule différence réside dans la combinaison des oligonucléotides. Pour chacun des mutants décrits dans le tableau 4, les combinaisons successives d'oligonucléotides sont décrites ci-après.

Mutant n° 10 : La création du mutant n° 10 nécessite trois séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole décrit ci-après en utilisant l'oligonucléotide n°21 lors de la première mutagenèse, l'oligonucléotide n° 23 lors de la deuxième et l'oligonucléotide n° 28 lors de la troisième. L'oligonucléotide n° 23 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n° 21 et l'oligonucléotide n° 28 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors des deux premières mutagenèses avec les oligonucléotides n° 21 et n° 23.

Mutant n° 11 : La création du mutant n° 11 nécessite trois séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole décrit ci-après en utilisant l'oligonucléotide n°21 lors de la première mutagenèse, l'oligonucléotide n° 23 lors de la deuxième et l'oligonucléotide n° 29 lors de la troisième. L'oligonucléotide n° 23 est défini pour reconnaître les modifications

apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n° 21 et l'oligonucléotide n° 29 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors des deux premières mutagenèses avec les oligonucléotides n° 21 et n° 23.

Mutant n° 12 : La création du mutant n° 12 nécessite trois séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole décrit ci-après en utilisant l'oligonucléotide n°22 lors de la première mutagenèse, l'oligonucléotide n° 26 lors de la deuxième et l'oligonucléotide n° 30 lors de la troisième. L'oligonucléotide n° 26 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n° 22 et l'oligonucléotide n° 30 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors des deux premières mutagenèses avec les oligonucléotides n° 22 et n° 26.

Mutant n° 13 : La création du mutant n° 13 nécessite trois séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole ci-après en utilisant l'oligonucléotide n°22 lors de la première mutagenèse, l'oligonucléotide n° 27 lors de la deuxième et l'oligonucléotide n° 31 lors de la troisième. L'oligonucléotide n° 27 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n° 22 et l'oligonucléotide n° 31 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors des deux premières mutagenèses avec les oligonucléotides n° 22 et n° 27.

Mutant n° 14 : La création du mutant n° 14 nécessite trois séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole décrit ci-après en utilisant l'oligonucléotide n°22 lors de la première mutagenèse, l'oligonucléotide n° 27 lors de la deuxième et l'oligonucléotide n° 32 lors de la troisième. L'oligonucléotide n° 27 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n° 22 et l'oligonucléotide n° 32 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors des deux premières mutagenèses avec les oligonucléotides n° 22 et n° 27.

Mutant n° 15 : La création du mutant n° 15 nécessite trois séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole ci-après en utilisant l'oligonucléotide n°21 lors de la première mutagenèse, l'oligonucléotide n° 24 lors de la deuxième et l'oligonucléotide n° 33 lors de la troisième. L'oligonucléotide n° 24 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n° 21 et l'oligonucléotide n° 33 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors des deux premières mutagenèses avec les oligonucléotides n° 21 et n° 24.

Mutant n° 16 : La création du mutant n° 16 nécessite trois séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole ci-après en utilisant l'oligonucléotide n°21 lors de la première mutagenèse, l'oligonucléotide n° 25 lors de la deuxième et l'oligonucléotide n° 34 lors de la troisième. L'oligonucléotide n° 25 est défini pour reconnaître les modifications apportées

lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n° 21 et l'oligonucléotide n° 34 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors des deux premières mutagenèses avec les oligonucléotides n° 21 et n° 25.

Selon ce protocole, les oligonucléotides destinés à créer les mutants n° 10 à n° 16 décrits dans le tableau 4 sont répartis en trois catégories, oligonucléotides de 1^{ère} série, oligonucléotides de 2^{ème} série et oligonucléotides de 3^{ème} série. Cette répartition est la suivante :

Oligonucléotides de 1^{ère} série : Oligonucléotides n° 21 et 22

Oligonucléotides de 2^{ème} série : Oligonucléotides n° 23, 24, 25, 26 et 27

Oligonucléotides de 3^{ème} série : Oligonucléotides n° 28, 29, 30, 31, 32, 33 et 34

3-2- Création de sites de coupure par la pepsine dans la boucle inter-hélice alpha5-alpha 6

La substitution de plusieurs acides aminés au sein de la boucle inter-hélice alpha5-alpha 6 nécessite pour chacun des mutants l'utilisation successive de plusieurs oligonucléotides de mutagenèse. Les oligonucléotides de mutagenèse nécessaires à la création des exemples de mutants présentés dans le tableau 5 sont présentés ci-après (numérotés de 35 à 44).

Oligonucléotide n° 35 :	gat gca tct ctt ttt TTa gaa gga tgg gga ttc Asp Ala Ser Leu Phe Leu Glu Gly Trp Gly Phe
Oligonucléotide n° 36 :	gat gca tct ctt ttt TTa TTa gga tgg gga ttc aca Asp Ala Ser Leu Phe Leu Leu Gly Trp Gly Phe Thr
Oligonucléotide n° 37 :	gat gca tct ctt ttt gAa gaa gga tgg gga ttc Asp Ala Ser Leu Phe Glu Glu Gly Trp Gly Phe
Oligonucléotide n° 38 :	tta gaa gga tgg gga TTa aca cag ggg gaa att Leu Glu Gly Trp Gly Leu Thr Gln Gly Glu Ile
Oligonucléotide n° 39 :	gga gaa gga tgg gga GAA aca cag ggg gaa att Gly Glu Gly Trp Gly Glu Thr Gln Gly Glu Ile
Oligonucléotide n° 40 :	gca tct ctt ttt tta gaa TTa tTT TTa ttc aca cag ggg gaa att Ala Ser Leu Phe Leu Glu Leu Phe Leu Phe Thr Gln Gly Glu Ile
Oligonucléotide n° 41 :	gca tct ctt ttt tta tta TTa tTT TTa ttc aca cag ggg gaa att Ala Ser Leu Phe Leu Leu Leu Phe Leu Phe Thr Gln Gly Glu Ile
Oligonucléotide n° 42 :	gca tct ctt ttt tta gaa TTa tTT TTa ttc aca cag ggg gaa att Ala Ser Leu Phe Leu Glu Glu Phe Glu Leu Thr Gln Gly Glu Ile
Oligonucléotide n° 43 :	gca tct ctt ttt gaa gaa TTa tTT TTa ttc aca cag ggg gaa att Ala Ser Leu Phe Glu Glu Glu Phe Glu Leu Thr Gln Gly Glu Ile
Oligonucléotide n° 44 :	gca tct ctt ttt gaa gaa TTa tTT TTa gaa aca cag ggg gaa att Ala Ser Leu Phe Glu Glu Glu Phe Glu Glu Thr Gln Gly Glu Ile

La procédure de mutagenèses dirigées successives est similaire à la procédure décrite dans l'exemple 2. La seule différence réside dans la combinaison des oligonucléotides. Pour chacun des mutants décrits dans le tableau 5, les combinaisons successives d'oligonucléotides sont décrites ci-après.

Mutant n° 17 : La création du mutant n°17 nécessite deux séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole décrit ci-après en utilisant l'oligonucléotide n° 35 lors de la première mutagenèse et l'oligonucléotide n° 40 lors de la seconde. L'oligonucléotide n° 40 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n° 35.

Mutant n° 18 : La création du mutant n° 18 nécessite deux séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole décrit ci-après en utilisant l'oligonucléotide n° 36 lors de la première mutagenèse et l'oligonucléotide n° 41 lors de la seconde. L'oligonucléotide n° 41 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n° 36.

Mutant n° 19 : La création du mutant n° 19 nécessite trois séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole ci-après en utilisant l'oligonucléotide n° 35 lors de la première mutagenèse, l'oligonucléotide n° 38 lors de la deuxième et l'oligonucléotide n° 42 lors de la troisième. L'oligonucléotide n° 38 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n° 35 et l'oligonucléotide n° 42 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors des deux premières mutagenèses avec les oligonucléotides n° 35 et n° 38.

Mutant n° 20 : La création du mutant n° 20 nécessite trois séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole ci-après en utilisant l'oligonucléotide n°37 lors de la première mutagenèse, l'oligonucléotide n° 38 lors de la deuxième et l'oligonucléotide n° 43 lors de la troisième. L'oligonucléotide n° 38 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n° 37 et l'oligonucléotide n° 43 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors des deux premières mutagenèses avec les oligonucléotides n° 37 et n° 38.

Mutant n° 21 : La création du mutant n° 21 nécessite trois séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole ci-après en utilisant l'oligonucléotide n° 37 lors de la première mutagenèse, l'oligonucléotide n° 39 lors de la deuxième et l'oligonucléotide n° 44 lors de la troisième. L'oligonucléotide n° 39 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n° 37 et l'oligonucléotide n° 44 est défini

pour reconnaître les modifications apportées lors des deux premières mutagenèses avec les oligonucléotides n° 37 et n° 39.

Selon ce protocole, les oligonucléotides destinés à créer les mutants n° 17 à n° 21 décrits dans le tableau 5 sont répartis en trois catégories, oligonucléotides de 1^{ère} série, oligonucléotides de 2^{ème} série et oligonucléotides de 3^{ème} série. Cette répartition est la suivante :

Oligonucléotides de 1^{ère} série : Oligonucléotides n° 35, 36 et 37

Oligonucléotides de 2^{ème} série : Oligonucléotides n° 38, 39, 40 et 41

Oligonucléotides de 3^{ème} série : Oligonucléotides n° 42, 43 et 44

3-3- Création de sites de coupure par la pepsine dans la boucle inter-hélice alpha6-alpha 7

La substitution de plusieurs acides aminés au sein de la boucle inter-hélice alpha 6-alpha 7 ne nécessite pour chacun des mutants qu'une seule mutagenèse. Les oligonucléotides de mutagenèse nécessaires à la création des exemples de mutants présentés dans le tableau 6 sont présentés ci-après (numérotés de 45 à 52).

Oligonucléotide n° 45 :	ggt tta gat cgt tta TTa gAa TTa aat act gaa agt tgg
	Gly Leu Asp Arg Leu Leu Glu Leu Asn Thr Glu Ser Trp
Oligonucléotide n° 46 :	ggt tta gat cgt tta TTa TTT TTa aat act gaa agt tgg
	Gly Leu Asp Arg Leu Leu Phe Leu Asn Thr Glu Ser Trp
Oligonucléotide n° 47 :	ggt tta gat cgt tta GAa TTa TTa aat act gaa agt tgg
	Gly Leu Asp Arg Leu Glu Leu Leu Asn Thr Glu Ser Trp
Oligonucléotide n° 48 :	ggt tta gat cgt tta TTa TTT TTT aat act gaa agt tgg
	Gly Leu Asp Arg Leu Leu Phe Phe Asn Thr Glu Ser Trp
Oligonucléotide n° 49 :	ggt tta gat cgt tta GAa GAa TTa aat act gaa agt tgg
	Gly Leu Asp Arg Leu Glu Glu Leu Asn Thr Glu Ser Trp
Oligonucléotide n° 50 :	ggt tta gat cgt tta GAa TTT TTa aat act gaa agt tgg
	Gly Leu Asp Arg Leu Glu Phe Leu Asn Thr Glu Ser Trp
Oligonucléotide n° 51 :	ggt tta gat cgt tta GAa TTT GAa aat act gaa agt tgg
	Gly Leu Asp Arg Leu Glu Phe Glu Asn Thr Glu Ser Trp
Oligonucléotide n° 52 :	ggt tta gat cgt tta GAa gAa GAa aat act gaa agt tgg
	Gly Leu Asp Arg Leu Glu Glu Glu Asn Thr Glu Ser Trp

L'oligonucléotide n° 45 est utilisé pour créer le mutant n° 22.

L'oligonucléotide n° 46 est utilisé pour créer le mutant n° 23.

L'oligonucléotide n° 47 est utilisé pour créer le mutant n° 24.

L'oligonucléotide n° 48 est utilisé pour créer le mutant n° 25.

L'oligonucléotide n° 49 est utilisé pour créer le mutant n° 26.

L'oligonucléotide n° 50 est utilisé pour créer le mutant n° 27.

L'oligonucléotide n° 51 est utilisé pour créer le mutant n° 28.

L'oligonucléotide n° 52 est utilisé pour créer le mutant n° 29.

Le protocole complet de réalisation de ces mutants est identique à celui décrit dans l'Exemple 2. Ce protocole est commun à chacune des séries de mutagenèses, seuls l'oligonucléotide de mutagenèse et l'oligonucléotide d'inhibition/restauration de la résistance à l'antibiotique changent.

Exemple 4 : Création de sites de coupure par la pepsine au niveau des boucles inter-hélices alpha 3-alpha 4, alpha 4-alpha 5, alpha 5-alpha 6 et alpha 6-alpha 7 de diverses toxines Cry

Plusieurs groupes de protéines Cry présentent des similitudes de structure. Il s'agit notamment des protéines appartenant aux familles Cry1, Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry16, Cry17, Cry19 ou Cry20. Ces similitudes sont démontrées dans la littérature (Schnepf *et al.*, 1998). D'autres protéines Cry non citées dans la littérature peuvent également présenter des similitudes de structure et de séquence avec ces familles. L'Exemple 4 a pour but de démontrer l'applicabilité de l'enseignement de la présente invention, tel qu'exemplifié sur la protéine Cry9Ca1 dans les Exemples 2 et 3, à toutes ces familles de structures similaires.

Les modifications dans les boucles inter-hélices décrites dans les Exemples 2 et 3 peuvent être réalisées de façon équivalente pour toutes les protéines Cry chez lesquelles on peut identifier des boucles inter-hélices similaires à celles présentes dans le domaine I de la toxine Cry9Ca1. Si la localisation et la séquence de ces boucles inter-hélices sont définies pour ces diverses toxines Cry, il est très facile pour un expert dans l'art de réaliser des modifications similaires à celles présentées dans les exemples 2 et 3 à partir des détails techniques fournis dans ces mêmes exemples 2 et 3. Dans le présent exemple, les éléments sont donnés pour permettre la création de sites spécifiques de dégradation par la pepsine chez les toxines Cry autres que la toxine Cry9Ca1 et notamment les protéines Cry1, Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry16, Cry17, Cry19 et Cry20. La modification de ces boucles inter-hélices pour créer des sites de dégradation par la pepsine chez les toxines Cry1, Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry16, Cry17, Cry19 ou Cry20 nécessite de suivre les étapes suivantes :

1) Etablir, d'après les séquences et les localisations des boucles inter-hélices présentées dans les tableaux 6 à 13 ci-dessous, des listes de mutants possibles possédant un ou plusieurs résidus leucine, phénylalanine ou acide glutamique comme présenté dans les tableaux 1, 4, 5 et 6 et dans les exemples 2 et 3.

2) Etablir les séquences des gènes mutants en tenant compte de la préférence de codons de l'organisme hôte, et si cet organisme est *B. thuringiensis* en utilisant préférentiellement les codons TTA, TTT et GAA pour la leucine, la phénylalanine et l'acide glutamique, respectivement.

3) Synthétiser des oligonucléotides de mutagenèse pour modifier la séquence des gènes codant pour les toxines sélectionnées sur le modèle de ceux présentés dans les exemples 2 et 3.

4) Utiliser des stratégies de mutagenèses simples ou multiples telles que décrites dans les exemples 2 et 3 et suivant les protocoles expérimentaux décrits en détail dans les exemples 2 et 3.

La localisation des boucles inter-hélices $\alpha 3$ - $\alpha 4$, $\alpha 4$ - $\alpha 5$, $\alpha 5$ - $\alpha 6$ et $\alpha 6$ - $\alpha 7$ du domaine I et leurs séquences sont présentées pour les toxines Cry1, Cry3, Cry1, Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry16, Cry17, Cry19 et Cry20 dans les tableaux 7, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 ci-dessous. Ces séquences sont présentées pour chacune des protéines holotypes telles que définies par le comité de classification de *Bacillus thuringiensis* (Crickmore *et al.*, 2001). Toutefois, les homologies de séquences intra-holotypes, c'est-à-dire à entre les différents sous-types d'un même holotype, étant très élevées, l'homme du métier saura adapter l'enseignement du présent Exemple 4 à tous les sous-types de protéines Cry.

Tableau 7. Localisation et séquence de la boucle inter-hélice alpha 3- alpha 4 chez les protéines Cry1

Protéine	Séquence en Acide aminé	Position sur la protéine	Séquence nucléotidique	Position sur le gène
CryIAa	DPTN	120 à 123	gatcctactaat	358 à 369
CryIAb	DPTN	120 à 123	gatcctactaat	358 à 369
CryIAc	DPTN	120 à 123	gatcctactaat	358 à 369
CryIAd	DPTN	120 à 123	gatcctactaat	358 à 369
CryIAe	DPTN	120 à 123	gatcctactaat	358 à 369
CryIAf	DPTN	120 à 123	gatcctactaat	358 à 369

CryIAg	DPTN	120 à 123	gatcctactaat	358 à 369
CryIBa	NRDD	139 à 142	aaccgtgatgat	415 à 426
CryIBb	NRND	144 à 147	aaccgaaatgat	430 à 441
CryIBc	NRND	144 à 147	aaccgaaatgat	430 à 441
CryIBd	NRND	144 à 147	aaccgaaatgat	430 à 441
CryICa	DPNN	119 à 122	gatcctaataat	355 à 366
CryICb	DPDN	119 à 122	gatcctgataat	355 à 366
CryIDa	DPTN	119 à 122	gatcctactaat	355 à 366
CryIDb	DPSN	119 à 122	gatccgtctaataat	355 à 366
CryIEa	DPTN	118 à 121	gatcctactaat	352 à 363
CryIEb	DPTN	117 à 120	gatcctactaat	349 à 360
CryIFa	NPNN	118 à 121	aatcctaataat	352 à 363
CryIFb	NPNN	118 à 121	aatcctaataat	352 à 363
CryIGa	DPNN	118 à 121	gatcctaataat	352 à 363
CryIGb	DPDN	118 à 121	gatcctgataac	352 à 363
CryIHa	SPNN	122 à 125	tctcctaataat	364 à 375
CryIHb	SPNN	121 à 124	tctcctaataat	361 à 372
CryIIa	NRNN	148 à 151	aatcgtaataac	442 à 453
CryIIb	NRNN	148 à 151	aatcgtaataac	442 à 453
CryIIc	NRNN	148 à 151	aatcgtaataac	442 à 453
CryIId	NRNN	148 à 151	aatcgcaataac	442 à 453
CryIIe	NRNN	148 à 151	aatcgcaacaac	442 à 453
CryIJa	DPDN	119 à 122	gatcctgataac	355 à 366
CryIJb	TPDN	119 à 122	actccagataac	355 à 366
CryIKa	NRND	145 à 148	aaccgaaatgat	433 à 444

Tableau 8. Localisation et séquence de la boucle inter-hélice alpha 4- alpha 5 chez les protéines CryI

Protéine	Séquence en acides aminés	Position sur la protéine	Séquence nucléotidique	Position sur le gène
CryIAa	LAVQNYQVPLL	148 à 158	ttggcagttcaaaattatcaagttcctctttta	442 à 474
	FLAVQNYQVPLL	148 à 158	tttgagttcaaaattatcaagttcctctttta	442 à 474
CryIAb	FAVQNYQVPLL	148 à 158	tttgagttcaaaattatcaagttcctctttta	442 à 474
CryIAc	FAVQNYQVPLL	148 à 158	tttgagttcaaaattatcaagttcctctttta	442 à 474
	LAVQNYQVPLL	148 à 158	ttggcagttcaaaattatcaagttcctctttta	442 à 474
CryIAd	FTVQNYQVPLL	148 à 158	tttacagttcaaaattatcaagtacacctcttcta	442 à 474
CryIAe	FTVQNYQVPLL	148 à 158	tttacagttcaaaattatcaagtacacctcttcta	442 à 474
CryIAf	FAVQNYQVPLL	148 à 158	tttgagttcaaaattatcaagttcctctttta	442 à 474
CryIAG	LAVQNYQVPLL	148 à 158	ttggcagttcaaaattatcaagttcctctttta	442 à 474
CryIBa	FAIRNQEVPLL	167 à 177	ttcgcaattagaaaccaagaagttccattattg	499 à 531
CryIBb	FRIRNEEVPLL	172 à 182	ttcagaatacgaatgaagaagttccattatta	514 à 546

CryIBc	FRIRNEEVPLL	172 à 182	ttcagaatcacgaaatgaagaagttccattatta	514 à 546
CryIBd	FRIRNEEVPLL	172 à 182	ttcagaatcacgaaatgaagaagttccattatta	514 à 546
CryICa	FRISGFVPLL	147 à 157	tttcgaatttctggatttgaagtacccctttta	439 à 471
CryICb	FRIAGFEVPLL	147 à 157	tttcgaatttctggatttgaagtacccctttta	439 à 471
CryIDa	FRVQNYEVALL	147 à 157	tttagagttcaaaattatgaagttgctctttta	439 à 471
CryIDb	LRVRNYEVALL	147 à 157	tttagagttcgtaattatgaagttgctctttta	439 à 471
CryIEa	LFSVQNYQVPFL	145 à 156	cttttttcagttcaaaattatcaagtccattttta	433 à 468
CryIEb	LFSVQGYEIPLL	144 à 155	cttttttcagttcaaggttatgaaattcctctttta	430 à 465
CryIFa	NFTLTSFEIPLL	145 à 156	aaattttacacttacaagttttgaaatccctctttta	433 à 468
CryIFb	NFTLTSFEIPLL	145 à 156	aaattttacacttacaagttttgaaatccctctttta	433 à 468
CryIGa	TLAIRNLEVNL	145 à 156	actttggcaattcggaaatcttgaggtagtgaattta	433 à 468
CryIGb	LMAIPGFELATL	145 à 156	cttatggcaattccagggtttgaattagctacttta	433 à 468
CryIHa	LREQGFEPILL	150 à 160	ctgagagaacaaggctttgaaattcctctttta	448 à 480
CryIHb	LREQGFEPILL	149 à 159	ctgagagaacagggtttgaaattcctctttta	445 à 477
CryIIa	FAVSGEEVPLL	176 à 186	tttgagtgcttgaggagggtaccattatta	526 à 558
CryIIb	FAVSGEEVPLL	176 à 186	tttgagtgcttgaggagggtaccattatta	526 à 558
CryIIc	FAVSGEEVPLL	176 à 186	tttgagtgcttgaggagggtaccattatta	526 à 558
CryIId	FAVSGEEVPLL	176 à 186	tttgagtttctggagaagagggtccgctatta	526 à 558
CryIIe	FAVSGEEVPLL	176 à 186	tttgagtgatcaggtgaggagggtaccattattg	526 à 558
CryIJa	FRIIGFEVPLL	147 à 157	tttcggataattggatttgaagtgccactttta	439 à 471
CryIJb	FRIPGFVPLL	147 à 157	tttcggattcccggatttgaagtgccacttcta	439 à 471
CryIKa	FSIRNEEVPLL	173 à 183	ttcagcatcacgaaacgaagagggtccattatta	517 à 549

Tableau 9. Localisation et séquence de la boucle inter-hélice alpha 5- alpha 6 chez les protéines CryI

Protéine	Séquence en Acide aminé	Position sur la protéine	Séquence nucléotidique	Position sur le gène
CryIAa	FGQRWGFD	178 à 185	tttgacaaaggtggggatttgat	532 à 555
CryIAb	FGQRWGFD	178 à 185	tttgacaaaggtggggatttgat	532 à 555
CryIAc	FGQRWGFD	178 à 185	tttgacaaaggtggggatttgat	532 à 555
CryIAd	FGQRWGFD	178 à 185	tttgacaaacgttggggatttgat	532 à 555
CryIAe	FGQRWGFD	178 à 185	tttgacaaacgttggggacttgat	532 à 555
CryIAf	CGQRSGFD	175 à 182	tgtggacaaaggtcgggatttgat	523 à 546
CryIAg	FGQRWGFD	178 à 185	tttgacaaaggtggggatttgat	532 à 555
CryIBa	FGSEFGLT	197 à 204	tttgtagtgaatttgggcttaca	589 à 612
CryIBb	FGSEWGMA	202 à 209	tttgtagtgaatgggggatggca	604 à 627
CryIBc	FGSEWGMA	202 à 209	tttgtagtgaatgggggatggca	604 à 627
CryIBd	FGSEWGMA	202 à 209	tttgtagtgaatgggggatggca	604 à 627
CryICa	FGERWGLT	177 à 184	tttgagaaagatggggattgaca	529 à 552
	FGERWGVV	177 à 184	tttgagaaagatggggagtgaca	529 à 552
CryICb	FGARWGLT	177 à 184	tttgagcaagatggggattgaca	529 à 552
CryIDa	FGERWGYD	177 à 184	ttcgagaaagatggggatatgat	529 à 552

CryIDb	YGQRWGFD	177 à 184	tacggtcagagatggggctttgac	529 à 552
CryIEa	FGQAWGFD	176 à 183	tttgggcaggcttggggatttgat	526 à 549
CryIEb	FGQRWGFD	175 à 182	tttgacaacgttggggatttgat	523 à 546
CryIFa	FGQGWGLD	176 à 183	tttgggcagggttggggactggat	526 à 549
CryIFb	FGQGWGLD	176 à 183	tttgggcagggttgggggctggat	526 à 549
CryIGa	FGERWGLT	176 à 183	tttgagaaagatggggattaaca	526 à 549
CryIGb	FGERWGLT	176 à 183	tttggggagagatggggattgaca	526 à 549
CryIHa	FGQRWGLD	180 à 187	tttgggcaaagatggggacttgac	538 à 561
CryIHb	FGQRWGLD	179 à 186	tttgacagagatggggacttgat	535 à 558
CryIIa	FGKEWGLS	206 à 213	tttgaaaagagtggggattatca	616 à 639
CryIIb	FGKEWGLS	206 à 213	tttgaaaagaatggggattatca	616 à 639
CryIIc	FEKNGGLS	206 à 213	tttgaaaagaatgggggattatca	616 à 639
CryIId	FGKEWGLS	206 à 213	tttgaaaagaatggggattgtca	616 à 639
CryIIf	FGKEWGLS	206 à 213	tttgaaaagagtggggattatct	616 à 639
CryIJa	FGERWGLT	177 à 184	tttgagagagatggggattgacg	529 à 552
CryIJb	FGERWGLT	177 à 184	ttcgagagagatggggattgacg	529 à 552
CryIKa	FGSEWGMS	203 à 210	tttgtagtgaatgggggatgtca	607 à 630

Tableau 10. Localisation et séquence de la boucle inter-hélice alpha 6- alpha 7 chez les protéines CryI

Protéine	Séquence en Acide aminé	Position sur la protéine	Séquence nucléotidique	Position sur le gène
CryIAa	VWGPD	218 à 222	gtatggggaccggat	652 à 666
CryIAb	VWGPD	218 à 222	gtatggggaccggat	652 à 666
CryIAc	VWGPD	218 à 222	gtatggggaccggat	652 à 666
CryIAd	VWGPD	218 à 222	gtatggggaccggat	652 à 666
CryIAe	VWGPD	218 à 222	gtatggggaccggat	652 à 666
CryIAf	VWGPD	215 à 219	gtatggggaccggat	643 à 657
CryIAg	VWGPD	218 à 222	gtatggggaccggat	652 à 666
CryIBa	LRGTN	237 à 241	ttgagagggacaaat	709 à 723
CryIBb	LRGTN	242 à 246	ttaagagggacaaat	724 à 738
CryIBc	LRGTN	242 à 246	ttaagagggacaaat	724 à 738
CryIBd	LRGTN	242 à 246	ttaagagggacaaat	724 à 738
CryICa	LPKST	217 à 221	ttaccgaaatctacg	649 à 663
CryICb	LPKST	217 à 221	ttaccaaaatctacg	649 à 663
CryIDa	LEGRF	217 à 221	ttggaaggtcgtttt	649 à 663
CryIDb	LEGSR	217 à 221	ttagagggatctcga	649 à 663
CryIEa	LPRTGG	216 à 221	ttaccacgaactggtggg	646 à 663
CryIEb	LPRNEG	215 à 220	ttaccacgtaatgaaggg	643 à 660
CryIFa	LRGTNT	216 à 221	ttaagaggtactaatact	646 à 663
CryIFb	LRGTNT	216 à 221	ttaagaggtactaatact	646 à 663
CryIGa	IGGIS	216 à 220	attggagggataagt	646 à 660

CryIGb	LNVR	216 à 220	ttaaagtataaga	646 à 660
CryIHa	FGGVS	220 à 224	tttgggtgtgtca	658 à 672
CryIHb	FGVVT	219 à 223	tttgggtgtgaaca	655 à 669
CryIIa	LRGTN	246 à 250	ttgaggggtacaaat	736 à 750
CryIIb	LRGTN	246 à 250	ttgaggggtacaaat	736 à 750
CryIIc	LRATN	246 à 250	ttgaggggtacaaat	736 à 750
CryIId	LRGTN	246 à 250	ttgaggggaacaaat	736 à 750
CryIIe	LRGTN	246 à 250	ttgagaggtacaaat	736 à 750
CryIJa	LGFRS	217 à 221	ctaggggttagatct	649 à 663
CryIJb	LGFTS	217 à 221	ctaggggttacttct	649 à 663
CryIKa	LRGTT	243 à 247	ttaagagggacaact	727 à 741

Tableau 11. Localisation et séquence de la boucle inter-hélice alpha 3- alpha 4 chez les protéines Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry16, Cry17, Cry19 et Cry20

Protéine	Séquence en acide aminé	Position sur la protéine	Séquence nucléotidique	Position sur le gène
Cry3Aa	NPVSSRN	153 à 159	aatcctgtgagttcacgaaat	457 à 477
Cry3Ba	APVNLRS	154 à 160	gcgcctgtaaatttacgaagt	460 à 480
Cry3Bb	TPLSLRS	154 à 160	acacctttaagtttgcgaagt	460 à 480
Cry3Ca	TPLTLRD	151 à 157	actccttgactttacagat	451 à 471
Cry4Aa	NNPNPQNTQD	160 à 169	aataatccaaacccacaaaataactcaggat	478 à 507
Cry4Ba	EPNNQSYRTA	136 à 145	gagcctaataaccagtcctatagaacagca	406 à 435
Cry7Aa	KQDDPEAILS	147 à 156	aaacaagatgatccagaagctatactttct	439 à 468
Cry7Ab	NPDDPATITR	147 à 156	aatcctgatgatccagcaactataacacga	439 à 468
Cry8Aa	NRNDARTRSV	158 à 167	aatcgcaatgatgcaagaactagaagtgtt	472 à 501
Cry8Ba	NPNGSRALRD	159 à 168	aatccaaatggttcaagagccttacgagat	475 à 504
Cry8Ca	NPHSTRSAAL	159 à 168	aaccacacagtacacgaagcgcagcactt	475 à 504
Cry9Aa	NPNSASAEEL	146 à 155	aatcctaattctgcttctgctgaagaactc	436 à 465
Cry9Ba	RPNGVRANLV	134 à 143	agaccaaacggcgtaagagcaaaccttagtt	400 à 429
Cry9Ca	DRNDTRNLSV	159 à 168	gatcgaaatgatacacgaaatttaagtgtt	475 à 504
Cry9Da	RPNGARASLV	159 à 168	agaccaaatggcgcaaggcctccttagtt	475 à 504
Cry9Ea	RPNGARANLV	159 à 168	agaccgaacggagcaagagctaacttagtt	475 à 504
Cry10Aa	ARTHANAKAV	162 à 171	gcacgtacacacgctaataagcagta	484 à 513
Cry16Aa	NYNPTSIDDV	109 à 118	aattataatccaacttctatagacgatgta	325 à 354
Cry17Aa	NKDDPLAIAEL	127 à 137	aataaagatgaccccttgctatagctgaatta	379 à 411
Cry19Aa	DPKSTGNLSTL	159 à 169	gatccaaaatctacaggttaatttaagcacctta	475 à 507
Cry19Ba	NKNNFASGEL	151 à 160	aataaaaataatttcgaagtgtgaactt	451 à 480
Cry20Aa	ERNRTRENGQ	141 à 150	gaacgtaatagaactcgtgaaaacggacaa	421 à 450

Tableau 12. Localisation et séquence de la boucle inter-hélice alpha 4- alpha 5 chez les protéines Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry16, Cry17, Cry19 et Cry20

Protéine	Séquence en acide aminé	Position sur la protéine	Séquence nucléotidique	Position sur le gène
Cry3Aa	ISGYEVL	186 à 192	attctggatacagaggttcta	556 à 576
Cry3Ba	VSKFEVL	187 à 193	gtttccaaattcgaagttctg	559 à 579
Cry3Bb	VSKFEVL	187 à 193	gtttccaaattcgaagtctg	559 à 579
Cry3Ca	VSGYEVL	184 à 190	gtctctggatacgaagttcta	550 à 570
Cry4Aa	LVNSCPPNPSCDYYNILVL	188 à 207		
			cttgtaaacctctgtcctcctaatacctagtgattgcgattactataacatactagtatta	562 à 621
Cry4Ba	FSNLVGYELLLL	164 à 175	tttagcaacttagtaggtatgaattattgttatta	490 à 525
Cry7Aa	FKVTGYEIPLL	175 à 185	tttaaggttactggatatgaaataccattacta	523 à 555
Cry7Ab	FRVAGYEIPLL	175 à 185	tttagggtgctggatatgaaataccattacta	523 à 555
Cry8Aa	FAVSGHEVLLL	186 à 196	ttgcagtatccggacacgaagtactattatta	556 à 588
Cry8Ba	FRVTNFEVPFL	187 à 197	tttcgagtgcacaaatttgaagtaccattcctt	559 à 591
Cry8Ca	FSQTNYETPLL	187 à 197	ttttctcaaacgaattatgagactccactctta	559 à 591
Cry9Aa	LTNGGSLARQNAQILLL	175 à 191	ttaacgaatgggtgctcgtagctagacaaaatgcccaaatattattatta	523 à 571
Cry9Ba	FGSGPGSQRFQAQLL	161 à 175	tttgtagtgccctggaagtcaaagggttcaggcacaattgttg	481 à 525
Cry9Ca	FAVNGQQVPLL	187 à 197	ttgcagtaaatggacagcaggttcattactg	559 à 591
Cry9Da	FGSGPGSQNYATILL	186 à 200	ttggctctggtcctggaagtcaaaattatgcaactatattactt	556 à 600
Cry9Ea	FGTGPGSQRDAVALL	186 à 200	ttggtaggggtcctggtaglc aaagagatcggttagcgtgttg	556 à 600
Cry10Aa	LKNNASYRIPTL	189 à 200	ttaaaaaataatgctagctatcgaataccaacactc	565 à 600
Cry16Aa	FKVKNYEVTVL	136 à 146	tttaagggttaaaaattatgaagtaacagtgtta	406 à 438
Cry17Aa	FKRANYEVLLL	155 à 165	tttaaaagggcgaattatgaagtcttactatta	463 à 495
Cry19Aa	VNNQGSPGYELLLL	187 à 200	gttaataatcaggggagtcaggttatgagttacttttattg	559 à 600
Cry19Ba	FSLGGYETVLL	180 à 190	ttctcattaggagggttatgaaacagtattatta	538 à 570
Cry20Aa	LSRRGFETLLL	173 à 183	ctttctgcagaggattcgaaactcttttatta	517 à 549



Tableau 13. Localisation et séquence de la boucle inter-hélice alpha 5- alpha 6 chez les protéines Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry16, Cry17, Cry19 et Cry20

Protéine	Séquence en Acide aminé	Position sur la protéine	Séquence nucléotidique	Position sur le gène
Cry3Aa	GEEWGYE	215 à 221	ggagaagaatggggatcacgaa	643 à 663
Cry3Ba	GEEWGYS	216 à 222	ggagaagaatggggatattct	646 à 666
Cry3Bb	GEEWGYS	216 à 222	ggagaagaatggggatattct	646 à 666
Cry3Ca	GTDWGYS	213 à 219	ggaacggattggggatattct	637 à 657
Cry4Aa	FEAYLKNNRQFDYLE	227 à 241	tttgaagcgtatttaaaaacaatcgacaattcgattatttagag	679 à 723
Cry4Ba	LINAQEWSL	193 à 201	ctcataaatgcacaagaatggtcttta	577 à 603
	PHKCTRMVY	193 à 201	cctcataaatgcacaagaatggtcttat	577 à 603
Cry7Aa	GDKWGF	206 à 211	ggagataaatggggattc	616 à 633
	GDKWEF	206 à 211	ggagataaatgggaattc	616 à 633
Cry7Ab	GDKWGF	206 à 211	ggagataaatggggattc	616 à 633
Cry8Aa	GEEWGF	217 à 222	ggagaagagtggggattt	649 à 666
Cry8Ba	GEEWGL	218 à 223	ggagaagaatggggattg	652 à 669
Cry8Ca	GKEWGY	218 à 223	gggaaggaatggggatat	652 à 669
Cry9Aa	RYGTNWGL	210 à 217	agatatggcactaattgggggcta	628 à 651
Cry9Ba1	KYGARWGL	194 à 201	aaglatggggcaagatggggactc	580 à 603
Cry9Ca	LFGEWGF	216 à 223	cttttggagaaggatggggattc	646 à 669
Cry9Da	IYGARWGL	219 à 226	atttatggagctagatgggggctg	655 à 678
Cry9Ea	IYGARWGL	219 à 226	atctatggggcaagatggggactt	655 à 678
Cry10Aa	TYYNLWLQ	219 à 226	acctattacaatatatggctgcaa	655 à 678
Cry16Aa	IYGDAWNLYRELGF	165 à 178	atttatggagatgcatggaatttatagagaattaggattt	493 à 534
Cry17Aa	LLNKVIDNF	184 à 192	cttttaataaagttatagataatttt	550 à 576
Cry19Aa	IYGDKWWSA	219 à 227	atttatggagataaatggtggagcgca	655 à 681
Cry19Ba	IYGKELG	209 à 215	atttacggaaaagaattagga	625 à 645
Cry20Aa	LYRNQWL	202 à 208	ctttatagaaatcaatgggta	604 à 624

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 260899

REMISE DES PIÈCES DATE 19 MARS 2001 LIEU 69 INPI LYON N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI 0103691 DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 19 MARS 2001		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE Aventis CropScience S.A. Hervé MONCONDUIT 14/20 rue Pierre Baizet BP 9163 69263 LYON Ccedex 09	
V s références pour ce dossier (facultatif) PM01008			
C nfirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
<i>Demande de brevet initiale</i> N° _____ Date ____/____/____ <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i> N° _____ Date ____/____/____			
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i> N° _____ Date ____/____/____			
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Toxine insecticide de Bacillus thuringiensis modifiée sensible à la pepsine			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		Aventis CropScience S.A.	
Prénoms			
Forme juridique		S.A.	
N° SIREN		
Code APE-NAF		
Adresse	Rue	55 avenue René Cassin	
	Code postal et ville	69009	LYON
Pays		FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		04.72.85.23.38	
N° de télécopie (facultatif)		04.72.85.28.43	
Adresse électronique (facultatif)			



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

REMISE DES PIÈCES DATE 19 MARS 2001 LIEU 69 INPI LYON N° D'ENREGISTREMENT 0103691 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI		DB 540 W / 260899
V s références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		PM01008		
6 MANDATAIRE				
Nom		MONCONDUIT		
Prénom		Hervé		
Cabinet ou Société		Aventis CropScience S.A.		
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		Employé		
Adresse	Rue	14-20 rue Pierre Baizet BP 9163		
	Code postal et ville	69263	LYON CEDEX 09	
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		04.72.85.23.38		
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		04.72.85.28.43		
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>				
7 INVENTEUR (S)				
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée		
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)		
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non		
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt <i>(joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence) :</i>		
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes				
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Franck TETAZ		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI 		

Tableau 14. Localisation et séquence de la boucle inter-hélice alpha 6- alpha 7 chez les protéines Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry16, Cry17, Cry19 et Cry20

Protéine	Séquence en Acide aminé	Position sur la protéine	Séquence nucléotidique	Position sur le gène
Cry3Aa	RGSS	255 à 258	agagggttcatct	763 à 774
Cry3Ba	RGST	256 à 259	agagggttcaact	766 à 777
Cry3Bb	RGST	256 à 259	agagggttcaact	766 à 777
Cry3Ca	RGST	253 à 256	agagggttcgact	757 à 768
Cry4Aa	LIKTTPD	274 à 280	ttaattaaaacgacgcctgat	820 à 840
Cry4Ba	LRNKS	235 à 239	cttagaaataaatct	703 à 717
Cry7Aa	LNGST	245 à 249	ttgaacgggtccact	733 à 747
Cry7Ab	LNGST	245 à 249	ttgaacgggtccact	733 à 747
Cry8Aa	LKGTT	256 à 260	ttgaaagggtaccact	766 à 780
Cry8Ba	LKGSS	257 à 261	ttaaagggtcgcgagc	769 à 783
Cry8Ca	LRGTG	257 à 261	ttaagagggaacgggt	769 à 783
Cry9Aa	LRQRGTS	252 à 258	ctaagacaacgaggcactagt	754 à 774
Cry9Ba1	LRGTS	236 à 240	ttacgaggaacgcgagc	706 à 720
Cry9Ca	LRGTN	257 à 261	ttaagagggaacaaat	769 à 783
Cry9Da	LRGTT	260 à 264	ttaagaggcacaacc	778 à 792
Cry9Ea	VRGTN	260 à 264	gtaagagggaacaaat	778 à 792
Cry10Aa	IRTNT	267 à 271	attagaactaatact	799 à 813
Cry16Aa	LKLDPN	210 à 215	ttaaaactagatccgaat	628 à 645
Cry17Aa	IKNKTRDF	224 à 231	ataaaaaataaaaactagggtttt	670 à 693
Cry19Aa	FRTAG	261 à 265	tttagaacagcaggt	781 à 795
Cry19Ba	KKQIG	250 à 254	aaaaaacaaatagga	748 à 762
Cry20Aa	DRSS	245 à 248	gatcgttcaagt	733 à 744

Des mutants peuvent être préparés pour chacun des gènes *cry* cités dans cet exemple sur le modèle des exemples 1, 2 et 3. Les procédures techniques utilisables pour la mise en oeuvre de la mutagenèse sont similaires celles présentées dans les exemples 1, 2 et 3.

Exemple 5 : Augmentation globale du contenu en leucine, phénylalanine et acide glutamique des protéines Cry

L'augmentation globale du contenu en leucine, phénylalanine et acide glutamique des protéines Cry est décrite ci-après pour la toxine Cry9Ca1. Bien que cet exemple soit réalisé sur la protéine Cry9Ca1 et le gène *cry9Ca1*, son enseignement est applicable à toutes les toxines Cry et tous les gènes *cry*. Cet enseignement s'applique notamment à toutes les toxines Cry dont la séquence est connue et déposée dans la base de données Genbank:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>.

Les numéros d'accès de Genbank des gènes *cry* sont disponibles sur le site suivant :

http://www.biol.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html.

Cet enseignement s'applique également à toutes les toxines Cry et gènes *cry* dont la séquence n'est pas divulguée sur Genbank.

A la différence des stratégies décrites dans les exemples 1 à 4, l'objectif n'est pas de modifier une région précise de la toxine pour intégrer des acides aminés reconnus par la pepsine mais d'augmenter globalement le nombre de ces sites par augmentation du taux de leucine, de phénylalanine et d'acide glutamique dans ladite toxine. Cette stratégie permet de rendre la toxine Cry plus sensible à la pepsine en augmentant le pourcentage de résidus reconnus par la pepsine. L'acide glutamique (E-Glu) est préférentiellement substitué à l'acide aspartique (D-Asp), la phénylalanine (F-Phe) remplace préférentiellement le tryptophane (W-Trp) et la leucine (L-Leu) remplace de préférence la valine (V-Val) ou l'isoleucine (I-Ile). Cette stratégie a nécessité la création d'un modèle tridimensionnel de la toxine Cry9Ca1 activée créé à partir de la séquence primaire de la protéine par comparaison avec les structures tridimensionnelles de Cry1Aa1 et Cry3Aa1. Le modèle a été créé en utilisant le serveur Swiss-Model Protein Modelling Server (Peitsch, 1995 ; Peitsch, 1996 ; Guex and Peitsch, 1997). L'adresse du serveur est la suivante : (<http://www.expasy.ch/swissmod/swiss-model.html>).

De façon préférentielle, les substitutions doivent atteindre un niveau maximum de 25 %. La toxine Cry9Ca1 activée contient 31 acides aspartiques, 9 tryptophanes et 47 valines. Il y a naturellement 26 acides glutamiques, 35 phénylalanines et 61 leucines. En tenant compte d'un maximum de 25% de substitution pour chacun des acides aminés, les rapports relatifs sont les suivants:

Acide aminé	Nombre de résidus dans Cry9Ca1 native	Nombre de résidus dans Cry9Ca1 modifiée
Asp (D)	31	24
Glu (E)	26	33
Trp (W)	9	7
Phe (F)	35	37
Val (V)	47	36
Leu (L)	61	72

La substitution de l'isoleucine (I-Ile) par la leucine peut également être envisagée en place ou en plus de la substitution de la valine par la leucine. Il y a naturellement 27 isoleucines dans la toxine Cry9Ca1. En tenant compte d'un taux de substitution préférentiel de 25%, il suffit de remplacer 6 résidus isoleucine par des leucines.

Il est possible de modifier la séquence du gène *cry9Ca1* comme montré ci-après. La démonstration ci-après n'a pour seul objectif que d'illustrer l'exemple et ne limite en rien la portée de l'invention. Cette démonstration porte sur le remplacement de résidus acides aspartique, phénylalanines et valines. Un homme du métier peut très facilement adapter cette approche à tout autre gène *cry* dont il connaîtrait la séquence et notamment à partir des séquences disponibles sur Genbank et dont les numéros d'accessions sont mentionnés sur le site suivant:

http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html

Les gènes *cry* généralement exprimés dans les plantes transgéniques sont des gènes tronqués, c'est à dire que seule la séquence du gène codant pour la toxine activée est introduite dans ces plantes. Les séquences présentées dans cet exemple correspondent à cette version tronquée et s'étendent selon le cas, gène ou protéine, du codon d'initiation ou de la première méthionine à 15 codons ou acides aminés en aval du bloc conservé 5 qui limite la toxine activée.

La séquence du gène *cry9Ca1* natif et tronqué est présentée dans la SEQ ID NO 1.

La séquence de la protéine Cry9Ca1 native et tronquée est présentée dans la SEQ ID NO 2.

La séquence d'un gène *cry9Ca1* modifié dans lequel tous les codons codant pour les résidus valine, acide glutamique et phénylalanine ont été modifiés est présentée dans la figure 1 (SEQ ID NO 9). Cette séquence modifiée est utilisable comme base pour la définition des divers oligonucléotides de mutagenèse pouvant être utilisés. Les bases modifiées sont représentées en caractères gras.

La séquence d'une protéine Cry9Ca1 modifiée dans laquelle tous les résidus valine, acide glutamique et phénylalanine ont été modifiés est présentée dans la figure 2 (SEQ ID NO 10)es acides aminés modifiés sont représentées en caractères gras.

L'ensemble des oligonucléotides de mutagenèse pouvant permettre de remplacer les résidus valine, phénylalanine et acide glutamique sont présentés dans la figure 3 (SEQ ID NO 94 à 160). Les bases modifiées sont représentées en caractères gras.

Une possibilité d'utilisation de certains oligonucléotides pour créer un gène *cry9Ca1* modifié dont le remplacement des codons codant pour les résidus valine, phénylalanine et acide glutamique a été réalisé à hauteur de 25% est présentée ci-après à titre illustratif. Cette illustration a pour objectif d'exemplifier la stratégie développée sans limiter la portée de l'invention. Sur la base de l'enseignement de cet exemple et des figures 1 à 3 (SEQ ID NO 9 et 10), l'homme du métier saura

adapter d'autres combinaisons des oligonucléotides présentés dans la figure 5 (SEQ ID NO 94 à 160) ou d'autres oligonucléotides préparés sur le même principe, en particulier pour le remplacement des résidus isoleucine.

La séquence d'un gène *cry9Ca1* modifié par remplacement des codons codant pour les résidus valine, phénylalanine et acide glutamique à hauteur de 25% est présentée dans la figure 4 (SEQ ID NO 11). Les bases modifiées sont en gras.

La séquence d'une protéine Cry9Ca1 modifiée par remplacement des résidus valine, phénylalanine et acide glutamique à hauteur de 25% est présentée dans la figure 5 (SEQ ID NO 12). Les acides aminés modifiés sont en gras.

La création d'un gène *cry9Ca1* modifiés dans lequel 25% des codons valine, phénylalanine et acide glutamique sont modifiés et dont la séquence est présentée en figure 4 (SEQ ID NO 11) peut être réalisée en utilisant, parmi ceux présentés dans la figure 5 (SEQ ID NO 94 à 160), les oligonucléotides suivants :

- Oligonucléotide n°60
- Oligonucléotide n°62
- Oligonucléotide n°67
- Oligonucléotide n°72
- Oligonucléotide n°77
- Oligonucléotide n°78
- Oligonucléotide n°80
- Oligonucléotide n°82
- Oligonucléotide n°83
- Oligonucléotide n°88
- Oligonucléotide n°90
- Oligonucléotide n°92
- Oligonucléotide n°96
- Oligonucléotide n°97
- Oligonucléotide n°103
- Oligonucléotide n°111

La méthode préférentiellement utilisée est une mutagenèse multiple avec un mélange des oligonucléotides mentionnés immédiatement ci-dessus. La procédure de mutagenèse dirigée est similaire celle décrite dans l'exemple 1 à la seule différence qu'un mélange d'oligonucléotides de mutagenèse est utilisé dans cet exemple alors qu'un seul oligonucléotide de mutagenèse est utilisé dans l'exemple 1. Le protocole employé est celui décrit dans les exemples 1 à 4. Il est commun à

chacune des séries de mutagenèses, seuls l'oligonucléotide de mutagenèse et l'oligonucléotide d'inhibition/restauration de la résistance à l'antibiotique changent.

Exemple 6 : Production des protéines Cry modifiées dans *B. thuringiensis* et purification

Les gènes natifs et modifiés sont insérés avec leurs séquences promotrices et terminatrices dans le vecteur navette *E. coli-B. thuringiensis* pHT3101 (Lereclus *et al.*, 1989).

L'ADN plasmidique est préparé par minipréparation selon la technique de la lyse alcaline (Birboim et Doly, 1979). Chaque colonie bactérienne est cultivée dans 2 ml de milieu LB additionné de l'antibiotique approprié pendant une nuit à 37 °C avec agitation (200 rpm). La culture est ensuite transférée dans un microtube puis centrifugée à 13500 g pendant 5 min. Après élimination du surnageant, les bactéries sont resuspendues dans 100 µl d'une solution de 25mM Tris-HCl, pH 8, 10mM EDTA contenant de la Rnase A à la concentration finale de 100 µg/ml. 200 µl d'une solution de NaOH 0,2M, 1% SDS sont rajoutés et la suspension est mélangée deux fois par inversion du microtube. 150 µl d'une solution d'acétate de potassium 2,55 M, pH 4,5 sont rajoutés et la suspension est incubée 5 min dans la glace. Après une centrifugation de 15 min à 13500 g, le surnageant est transféré dans un microtube contenant 1 ml d'éthanol froid. Après une centrifugation de 30 min. à 13500 g, le surnageant est éliminé et le culot lavé avec 1 ml d'éthanol 70%. Le culot contenant l'ADN est séché quelques minutes sous vide puis repris dans 50 µl d'eau distillée stérile. Les échantillons sont ensuite placés à 65°C pendant 30 min.

Les digestions par endonucléases de restriction sont réalisées pour 1 µg d'ADN dans un volume final de 20 µl en présence d'un dixième de volume final de tampon 10X conseillé par le fournisseur pour chaque enzyme et à l'aide de 5 unités d'enzyme. La réaction est incubée pendant 2 à 3 h à la température optimale pour l'enzyme.

La déphosphorylation des extrémités 5' engendrées par une enzyme de restriction est réalisée avec la phosphatase alcaline d'intestin de veau. La réaction se fait en utilisant 5 µl de tampon de déphosphorylation 10X (500 mM Tris-HCl, pH 9,3, 10 mM MgCl₂, 1mM ZnCl₂, 10 mM spermidine) et une unité d'enzyme par µg d'ADN dans un volume final de 50 µl. La réaction est incubée pendant une heure à 37°C dans la cas d'extrémités 5' sortantes ou à 55°C dans la cas d'extrémités franches ou 3' sortantes. Après la déphosphorylation, l'enzyme est ensuite inactivée pendant 30 min. à 65°C puis éliminée avec deux extractions volume à volume avec un mélange de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25-24-1). Les ligatures se font à l'aide de l'ADN ligase du phage T4. Elle est réalisée avec une quantité de vecteur égale à 100 ng et un rapport molaire insert/vecteur compris entre 5 et 10. Le volume final de la réaction est de 30 µl et comprend 3 µl de tampon de ligature 10X (300 mM Tris-HCl, pH 7,8, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM ATP) et 3 unités d'enzyme. La réaction est incubée une nuit à 14°C.

La construction est insérée dans une souche acristallophore de *B. thuringiensis* selon une méthode dérivée de celle décrite en 1989 par Lereclus *et al* et décrite par ailleurs (Rang *et al.*,



1999, 2000). Une préculture de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 acristallophore est incubée une nuit à 37°C sous agitation dans 10 ml de milieu BHI (Difco). 250 ml de milieu BHI sont ensuite inoculés avec 5 ml de préculture et incubés à 37°C sous agitation jusqu'à ce que la DO à 600 nm de la culture atteigne la valeur de 0,3. La culture est alors centrifugée à 1000g à 4°C pendant 10 min. Le surnageant est éliminé et le culot bactérien est rincé avec 50 ml d'eau distillée stérile froide. Les bactéries sont centrifugées à nouveau pendant 10 min à 1000g à 4°C. Le culot est repris dans 4 ml d'une solution froide et stérile de PEG-6000 40% et placé dans de la glace. 200 µl de bactéries sont alors mélangés avec 5 µg d'ADN plasmidique puis placées dans une cuvette d'électroporation de diamètre 0,2 cm. La cuvette est alors placée dans la chambre d'électroporation et un courant correspondant aux caractéristiques suivantes: 2,5 kV, 1000 Ω, 25 µF est délivré. Les bactéries sont ensuite récupérées, placées 10 min. dans de la glace avant d'être additionnées à 2 ml de milieu BHI et incubées à 37°C sous agitation pendant 90 min. 200 µl de culture sont alors étalés sur des boîtes de Pétri contenant du milieu usuel (IEBC, 1994) solide additionné d'érythromycine à la concentration finale de 25 µg/ml et incubés toute une nuit à 28°C.

Les souches recombinantes de *Bacillus thuringiensis* exprimant le gène natif ou les gènes mutés sont cultivées dans 250 ml de Milieu Usuel contenant de 25 µg/ml d'érythromycine sous agitation à 28°C. La croissance des bactéries est vérifiée par observation en microscopie optique à contraste de phase. Les bactéries sont cultivées jusqu'à la lyse bactérienne après sporulation. La culture est alors centrifugée à 5000 g pendant 10 min. Le culot est lavé avec 125 ml de NaCl 1M et la suspension est à nouveau centrifugée à 5000g pendant 10 min. Le culot est alors repris dans 15 ml d'eau distillée stérile contenant 1mM de PMSF, incubé dans la glace et traité aux ultrasons (100W) pendant 1 min afin de dissocier les amas entre les spores et les cristaux. La suspension est ensuite déposée sur un gradient discontinu de NaBr composé d'une couche de 4 ml de concentration 38,5%, de 4 couches de 6 ml de 41,9%, 45,3%, 48,9% et 52,7% et d'une couche de 3 ml de 56,3%. Le gradient est alors centrifugé à 20000 g pendant 90 min à 20°C. Les différentes composantes de la suspension (spores, débris cellulaires, corps parasporaux) se positionnent dans le gradient à différents niveaux selon leur densité. Chaque bande est récupérée et lavée trois fois à l'aide d'un volume d'eau distillée stérile. Chaque bande est observée en microscopie optique à contraste de phase. La fraction contenant les corps d'inclusion est conservée à -20°C dans de l'eau distillée stérile contenant 1 mM de PMSF pour analyse ultérieure.

Exemple 7 : Analyse de la stabilité des protéines aux protéases

La première analyse de stabilité réalisée est la vérification de la stabilité à la trypsine. Les protéines présentes dans le corps d'inclusion parasporal sont solubilisées pendant une heure à 37°C dans le tampon de solubilisation (50 mM Na₂CO₃, pH 10,8, 14,6 mM 2-mercapthoethanol). La suspension est ensuite centrifugée à 14000 g pendant 10 min afin d'éliminer le matériel non

soluble. Le surnageant est alors additionné d'un dixième du volume total de trypsine 0,05% et incubé 2 h à 37°C. L'état des protéines après traitement à la trypsine est vérifié par analyse en gels de polyacrylamide-SDS selon la méthode de Laemmli (1970). Cette technique permet la séparation des protéines selon leur masse moléculaire grâce à la présence de SDS qui confère une charge globale négative à toutes les protéines. L'échantillon est d'abord traité en rajoutant un volume de solution de traitement 2X (125 mM Tris-HCl, 20% glycérol, 4% SDS, 10% 2-mercaptoéthanol, 0,01 % bleu de bromophénol) puis est dénaturé 5 min dans de l'eau bouillante. L'échantillon est ensuite déposé sur le gel et traverse d'abord un premier gel de tassement composé d'un mélange acrylamide-bisacrylamide 4%, 0,1% SDS, et de Tris-HCl 125mM, pH 6,8. L'échantillon traverse ensuite le gel de séparation composé d'acrylamide-bisacrylamide 12%, 0,1% SDS, et de Tris-HCl 375mM, pH 8,8 et qui permet la séparation des différentes protéines en fonction de leur taille. L'électrophorèse est réalisée à 100V dans du tampon de migration (25 mM Tris-HCl, pH 8,3, 192 mM glycine, 0,1% SDS) jusqu'à ce que le bleu de bromophénol sorte du gel. Le gel est ensuite coloré une heure à l'aide d'une solution de méthanol 40%-acide acétique 7% contenant 0,025% de bleu de Coomassie puis décoloré à l'aide d'une solution méthanol 50%-acide acétique 10%. Le gel est définitivement fixé dans une solution de méthanol 5%-acide acétique 7%.

La seconde analyse est la vérification de la stabilité aux sucs digestifs d'insectes. Les toxines stables à la trypsine sont purifiées par FPLC (Pharmacia) à l'aide d'une colonne échangeuse d'anions (Q-Sepharose) équilibrée avec une solution de 40 mM de Na₂CO₃, pH 10,7. L'élution est réalisée à l'aide d'un gradient de 50 à 500 mM de NaCl. La DO à 280 nm des fractions est mesurée et les fractions contenant les protéines sont analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS. Les fractions contenant la toxine sont rassemblées et dialysées à 4°C contre de l'eau distillée pendant environ 48h jusqu'à la précipitation des protéines. La suspension protéique est ensuite centrifugée à 8000 g et à 4°C pendant 30 min. Les toxines contenues dans le culot sont resuspendues dans de l'eau distillée puis dosées selon Bradford (1976). Elles sont ensuite réparties en fractions aliquotes de 100 µg, lyophilisées puis stockées à 4°C. Avant leur utilisation, les toxines sont solubilisées et placées à la concentration de 10 mg/ml à l'aide de Tris 25mM, pH 9,5 en vue de tester leur stabilité aux sucs digestifs de larves d'*Ostrinia nubilalis*. Le suc digestif des larves d'*O. nubilalis* peut être prélevé soit par régurgitation induite par un choc électrique selon la procédure de Ogiwara *et al.* (1992), soit par dissection des larves et collecte du jus intestinal avec une pipette selon la méthode décrite par Baines *et al.* (1994). Dans les deux cas entre 100 et 200 individus sont nécessaires à la collecte du suc digestif. Le suc collecté est centrifugé à 15000 g pendant 15 minutes à 4°C avant

utilisation. La concentration en protéine du suc digestif est déterminée par la méthode de Bradford (BioRad). La réaction est conduite pendant 15 minutes à 37°C avec un rapport 1:1 (basé sur la concentration en protéine du suc digestif) de toxine et de suc digestif. La réaction est arrêtée avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Protease Inhibitors Set, Roche Diagnostics) mélangée avec un volume équivalent de solution de traitement 2X (125 mM Tris-HCl, 20% glycérol, 4% SDS, 10%, 2-mercaptoéthanol, 0,01 % bleu de bromophénol), puis incubée 5 minutes dans de l'eau bouillante. Les protéines sont alors analysées par SDS-PAGE selon la procédure décrite ci-dessus pour déterminer leur résistance aux sucs digestifs des larves et leur état de dégradation éventuel.

Le dernier type d'analyse de stabilité réalisé est celui de la stabilité à la pepsine. Les toxines natives et modifiées lyophilisées sont dissoutes dans un tampon gastrique (0,5 mg NaCl, 1,75 ml HCl 1M dans 250 ml H₂O, pH 2.0) simulant le fluide stomacal des mammifères et contenant 0,32% de pepsine. Des échantillons sont retirés après 0, 5, 15, 60 et 240 minutes d'incubation à 37°C puis analysés par électrophorèse en gels de polyacrylamide-SDS comme décrit ci-dessus. Ces conditions sont identiques celles décrites dans le rapport d'évaluation de l'EPA (United States Environmental Protection Agency) n° 4458108.

Cette série d'analyses permet de visualiser l'état de conservation des protéines natives et mutées, et donc leur stabilité, à diverses protéases présentes chez les insectes (trypsine et sucs digestifs) et par conséquent de vérifier que les protéines mutées ont effectivement conservé leur stabilité chez l'insecte. Ces analyses permettent également de vérifier que les protéines mutées sont effectivement dégradées par la pepsine dans les conditions similaires à celles présentes dans l'estomac des mammifères.

Exemple 8 : Analyse des propriétés insecticides

L'analyse de propriétés insecticides est réalisée au travers de deux types d'expérimentations permettant de tester les deux étapes du processus de toxicité chez l'insecte : la reconnaissance du site récepteur et l'évaluation de la toxicité *in vivo*.

L'analyse de l'affinité des toxines pour le site récepteur est réalisée à l'aide de toxine radiomarquées à l'iode 125 (¹²⁵I). Les toxines activées purifiées par FPLC et lyophilisées sont reprise dans du tampon de stockage (Tris-HCl 20 mM, pH 8.6) et analysées par SDS-PAGE pour vérifier leur état. Une fraction aliquote est dosée selon la méthode de Bradford (1976). Les toxines sont iodinyllées selon la méthode de la chloramine-T (Markwell, 1982). 25 µg de toxine

sont incubés pendant 5 min à température ambiante avec 0.25 mCi de Na-¹²⁵I et une « Iodo-bead » (Pierce) dans 50 µl de tampon sodium carbonate (50 mM Na₂CO₃, pH 10). La réaction de iodinylation est ensuite déposée à la surface d'une colonne de dessalage au dextran (Pierce) équilibrées avec du tampon CBS (50 mM Na₂CO₃, pH 10,8, 150 mM NaCl) pour éliminer l'iode libre. Le marquage et la qualité de la protéine sont vérifiés par analyse par SDS-PAGE suivie d'une autoradiographie. L'activité spécifique moyenne d'une toxine marquée est de 100000 cpm/pmol.

Afin de préparer les vésicules de membrane de la bordure en brosse (BBMV) sur lesquels l'étude de l'affinité des toxines pour les récepteurs est réalisée, les insectes sont élevés jusqu'au dernier stade larvaire. L'insecte utilisé est *Ostrinia nubilalis*, mais la méthodologie mise en œuvre est applicable à toute autre espèce d'insecte. L'utilisation d'une autre espèce d'insecte nécessite d'adapter les conditions d'élevage et le milieu nutritif à chacune des espèces envisagées, ce qui est facilement réalisable par toute personne experte dans l'art. Les larves d'*Ostrinia nubilalis* sont élevées sur milieu nutritif artificiel meridic (Lewis et Lynch, 1969 ; Reed *et al.*, 1972 ; Ostlie *et al.*, 1984). La méthode d'élevage des larves d'*Ostrinia nubilalis* est celle décrite par Huang *et al.* (1997). Les larves sont élevées individuellement dans des plateaux à 128 puits (Bio-Ba-128, C-D International). Chaque puits contient 2 ml de milieu artificiel. Après dix jours les larves sont transférées dans des boîtes plus larges (18,4 cm de diamètre et 7,6 cm de hauteur) contenant 300 ml de milieu nutritif artificiel. Du carton ondulé est placé à l'intérieur en guise de site de pupaison. Lors de la phase larvaire la température de la cellule d'élevage est de 25°C avec un éclairage constant (24 h). Les cartons contenant les chrysalides sont transférés dans des cages grillagées pour l'émergence et l'élevage des adultes. Du papier ciré est déposé dans la cage pour recevoir les pontes. Les pontes sont prélevées et maintenant en attente à 15°C. L'élevage des adultes est conduit à 25°C avec 75% d'humidité relative et 14 h de photopériode.

Pour la conduite des tests d'affinité des toxines pour les sites récepteurs, les larves sont collectées en début de 5^{ème} stade larvaire et mises à jeûner pendant 6 heures. Elles sont alors prélevées et déposées sur de la glace pendant 5 minutes. Les larves sont disséquées et le tube digestif est retiré. Les tubes digestifs disséqués sont groupés par 20, déposés dans un cryotube contenant du tampon MET (300mM mannitol, 5mM EGTA, 17mM Tris-HCl, pH 7.5), congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80C.

Les BBMV sont préparés selon la méthode de précipitation différentielle au magnésium (Wolfersberger *et al.*, 1987 ; Nielsen-LeRoux et Charles, 1992). Les BBMV sont repris dans du tampon TBS (20mM Tris-HCl, pH 8.5, 150mM NaCl) et la concentration totale en protéine est déterminée par la méthode de Bradford utilisant le kit Biorad et de la sérualbumine bovine (BSA) comme standard (Bradford, 1976).

Les tests de reconnaissance de récepteurs *in vitro* sont réalisés dans des microtubes de 1,5 ml en polyéthylène dans du tampon phosphate de sodium 20 mM pH 7.4 contenant 0.15 M de NaCl et 0.1% de sérualbumine bovine (PBS/BSA). Les tests sont réalisés, en double exemplaires, à température ambiante dans un volume total de 100 µl, avec 10 µg de protéine de BBMV. Les toxine fixées sur les BBMV sont séparées des toxines libres par centrifugation à 14,000 x g pendant 10 min, à température ambiante. Les culots de chaque échantillon, contenant la toxine fixé sur la membrane, sont rincés deux fois avec 200 µl de tampon PBS/BSA (20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0.1% BSA, pH 8.5) froid puis centrifugés. Les culots sont finalement resuspendus dans 200 µl de tampon PBS/BSA et ajoutés à 3 ml de cocktail scintillant HiSafe 3 (Pharmacia) dans une fiole à scintillation. Le comptage est réalisé dans un compteur à scintillation liquide.

Les tests de fixation directe sont conduit selon le protocole de Nielsen-LeRoux et Charles (1992). 30 µg de BBMV par microtube sont incubés avec une série de concentrations de 1 à 100 mM de toxine marquée à l'iode ^{125}I dans du tampon Tris / BSA buffer (20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0.1% BSA, pH 8.5). Le taux d'accrochage non spécifique est déterminé dans des expériences parallèles en présence d'un excès de 300 fois de toxine non marquée. Après 90 minutes d'incubation à température ambiante les échantillons sont centrifugés à 14000 g pendant 10 minutes à 4°C. Les culots sont rincés deux fois avec du tampon Tris/BSA froid et ressuspendus dans 150 µl du même tampon et ajoutés à 3 ml de cocktail scintillant HiSafe 3 (Pharmacia) dans une fiole à scintillation. Chaque expérience est réalisée en double et chaque point expérimental est compté deux fois dans un compteur à scintillation liquide. Les données sont analysées à l'aide du logiciel LIGAND (Munson and Rodbard, 1980) commercialisé par la Société Biosoft.

Les expériences de compétition homologue sont réalisées comme décrit précédemment pour les expériences d'accrochage direct avec 10 µg de BBMV dans un volume total de 100 µl pendant 90 min à température ambiante. Les BBMV sont incubés dans une concentration fixe de 10 nM de toxine marquée à l'iode ^{125}I en présence d'une série de concentrations (de 0.1 à 300 fois la concentration de la toxine marquée) dans du tampon Tris/BSA. La valeur de l'accrochage

non spécifique (l'accrochage toujours présent en présence d'un excès de 300 fois de la toxine non marquée) est soustrait de la valeur totale comptée. Chaque expérience est réalisée en double et chaque point expérimental est compté deux fois dans un compteur à scintillation liquide. Les données sont analysées à l'aide du logiciel LIGAND (Munson and Rodbard, 1980) commercialisé par la Société Biosoft.

Les tests de toxicité *in vivo* sont réalisés selon la procédure décrite par Lambert *et al.* (1996). La toxine activée et solubilisée est incorporée dans le milieu nutritif à diverses concentrations encadrant la dose létale 50% (DL₅₀) de Cry9Ca1 pour *Ostrinia nubilalis* qui est de 96,6 ng de toxine par cm² de surface de milieu. Six doses de 0,1 ng/cm², 1 ng/cm², 10 ng/cm², 100 ng/cm², 1000 ng/cm² et 10000 ng/cm² sont utilisées pour évaluer la DL₅₀ des toxines natives et modifiées. Les tests de toxicité sont réalisés sur des larves néonates dans des plaques de 24 puits de 2 cm² (Multiwell-24 plates, Corning Costar Corp.). 50 µl de chacune des dilutions de toxine sont étalés sur le milieu et séchés sous une hotte à flux. Une larve est déposée dans chaque puits et un total de 24 larves est utilisé pour chaque dose (une plaque par dose). Pour chaque dose le test est répété au moins trois fois. Un contrôle est réalisé avec de l'eau distillée. Les plaques sont couvertes et déposées à 25°C, 70% d'humidité relative et avec un photopériode 16 h. La mortalité est contrôlée après 7 jours et la DL₅₀ est calculée selon la méthode des probits (Finney, 1971).

Références bibliographiques

- Abdul-Rauf, M. and Ellar, D.J. 1999. Mutations of loop 2 and loop 3 residues in domain II of *Bacillus thuringiensis* CryC δ -endotoxin affect insecticidal specificity and initial binding to *Spodoptera littoralis* and *Aedes aegypti* midgut membranes. *Current Microbiology*. **39**:94-98.
- Aronson, A. I., D. Wu, and C. Zhang. 1995. Mutagenesis of specificity and toxicity regions of a *Bacillus thuringiensis* protoxin gene. *J. Bacteriol.* **177**:4059-4065.
- Baines, D., A. Brownright and J.L. Schwartz. 1994. Establishment of primary and continuous cultures of epithelial cells from larval lepidopteran midguts. *J. Insect. Physiol.* **40** : 347-357.
- Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acids Res.* **7**: 1513.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72** : 248-254.
- Chen, X.J., Lee, M.K. and Dean, D.H. (1993) Site-directed mutations in a highly conserved region of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin affect inhibition of short circuit current across *Bombyx mori* midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** : 9041-9045.
- Coux, F., V. Vachon, C. Rang, K. Moozar, L. Masson, M. Royer, M., Bes, S. Rivest, J.L. Schwartz, R. Laprade and R. Frutos. 1999. Role of interdomain salt bridges in the pore-forming ability of insecticidal toxin Cry1Aa of *Bacillus thuringiensis*. 32nd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology. 22 - 27 August 1999, Irvine, Californie, USA.
- Crickmore, N. 2001. http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/list.html
- Crickmore, N., . Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., and Dean, D. H. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 807-813.
- de Maagd, R. A., P. Bakker, N. Staykov, S. Dukiandjiev, W. Stiekema, and D. Bosch. 1999. Identification of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C domain III amino acid residues involved in insect specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(10):4369-4374.
- Dean, D.H., Rajamohan, F., Lee, M.K., Wu, S.J., Chen, X.J., Alcantara, E., Hussain, S.R. 1996. Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis – a minireview. *Gene*. **179** : 111-117.
- Finney, D.J. 1971. Probit analysis. A statistical treatment of the sigmoid response curve. *University Press, Cambridge*.
- Gazit, E. and Shai, Y. 1993. Structural and functional characterization of the $\alpha 5$ segment of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Biochemistry*. **32** : 3429-3436.
- Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J.-L., Brousseau, R. and Cygler, M. (1995) *Bacillus thuringiensis* Cry1A(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* **254** : 447-464.

- Guex, N. and Peitsch, M. C. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis*. **18** : 2714-2723.
- Huang, F. R. A. Higgins and L. L. Buschman. 1997. Baseline susceptibility and changes in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* under selection pressure in European corn borer (Lepidoptera : Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* **90** : 1137-1143.
- Hussain, S. R. A., A. I. Aronson, and D. H. Dean. 1996. Substitution of residues on the proximal side of CryIA *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins affects irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **226**(1):8-14.
- Hutchinson C.A., S. Phillips, M.H. Edgell, S. Gillam, P. Jahnke, and M. Smith. 1978. Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *J. Biol. Chem.* **253**: 6551.
- IEBC. 1994. Collection of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* (classified by serotypes). Institut Pasteur Paris
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227** : 680-685.
- Lambert, B., Buysse, L., Decock, C. Jansen, S. Piens, C., Saey, B., Seurinck, J., Van Audenhove, K., van Rie, J., van Vliet, A. and Peferoen, M. 1996. A *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a high activity against members of the family Noctuidae. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** : 80-86.
- Lee, M.K., You, T.H., Gould, F.L., and Dean D.H. 1999. Identification of residues in domain III of *Bacillus thuringiensis* CryIAc toxin that affect binding and toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 4513-4520.
- Lereclus, D., Arantes, S.O., Chauffaux, J. and Lecadet, M.M. 1989. Transformation and expression of a cloned delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **60** : 211-217.
- Lewis, L.C. and R.E. Lynch. 1969. Rearing the European corn borer on diets containing corn leaf and wheat germ. *Iowa State J. Sci.* **44** : 9-14.
- Li, J., Carroll, J. and Ellar, D.J. (1991) Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* **353** : 815-821.
- Manoj Kumar, A.S. and Aronson, A.I. 1999. Analysis of mutations in the pore-forming region essential for insecticidal activity of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *J. Bacteriol.* **181** : 6103-6107.
- Markwell, M.A.K. 1982. A new solid-state reagent to iodinate proteins. I-Conditions for the efficient labelling of antiserum. *Anal. Biochem.* **125**: 427-432.
- Masson, L., B. E. Tabashnik, Y. B. Liu, R. Brousseau, and J. L. Schwartz. 1999. Helix 4 of the *Bacillus thuringiensis* CryIAa toxin lines the lumen of the ion channel. *J. Biol. Chem.* **274**:31996-32000.
- Munson, P.J. & Rodbard, D. 1980. LIGAND: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Anal. Biochem.* **107**, 220-239.



Nielsen-LeRoux, C.; Charles, J.F. 1992. Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush border membranes from mosquito larvae. *Eur. J. Biochem.* **210**: 585-590.

Ogiwara, K., L. S. Indrasith, S. Asano and H. Hori. 1992. Processing of δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and HD-73 by gut-juices of various insect larvae. *J. Invert. Pathol.* **60** : 121-126.

Ostlie, K.R., G. L. Hein, L. G. Higley, L. V. Kaster and Showers, W. B. 1984. European corn borer (Lepidoptera : Pyralidae) development, larval survival, and adult vigor on meridic diets containing marker dies. *J. Econ. Entomol.* **77** : 118-120.

Peitsch, M. C. 1995. Protein modeling by E-mail. *Bio/Technology.* **13** : 658-660.

Peitsch, M. C. 1996. ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem. Soc. Trans.* **24** : 274-279.

Rajamohan, F., Alcantara, E., Lee, M.K., Chen, X.J., Curtiss, A. and Dean, D.H. (1996) Single amino acid changes in domain II of *Bacillus thuringiensis* CryIAb δ -endotoxin affect irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **177** : 2276-2282.

Rajamohan, F., M. K. Lee, and D. H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins: molecular mode of action. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* **60**:1-27.

Rang, C., L. Lacey, and R. Frutos. 2000. The crystal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *thompsoni* display a synergistic activity against the codling moth, *Cydia pomonella*. *Current Microbiology* **40** : 200-204.

Rang, C., Vachon, V., Coux, F., Carret, C., Moar, W.J., Brousseau, R., Schwartz, J.L., Laprade, R. and Frutos, R. 2001. Exchange of domain I from *Bacillus thuringiensis* CryI toxins influences protoxin stability and crystal formation. *Current Microbiology*. In Press.

Rang, C., Vachon, V., de Maagd, R.A., Villalon, M., Schwartz, J.-L., Bosch, D., Frutos, R. and Laprade, R. 1999. Interaction between functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 2918-2925.

Reed, G. L., W. B. Showers, J. L. Huggans and S. W. Carter. 1972. Improved procedures for mass rearing the European corn borer. *J. Econ. Entomol.* **65** : 1472-1476.

Sambrook, J., E.F. Fritsch and T Maniatis. 1989. Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Nolan C. ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** : 5463-5467.

Schnepf, E., N. Crickmore, J. van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler, and D. H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:775-806.

Terra, W. B. and C. Ferreira. 1994. Insect digestive enzymes : properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* **109B** : 1-62.

Vachon, V. F. Coux, F., G. Préfontaine, C. Rang, L. Marceau, L. Masson, R. Brousseau, R. Frutos, J. L. Schwartz, and R. Laprade, R. 2000. Role of α -helix three charged residues in pore formation by the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa. 33rd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology. 13-18 August 2000, Guanajuato, Mexico.

Wolfersberger, M. G.; Luthy, P.; Maurer, A.; Parenti, P.; Sacchi, V.; Giordana, B.; Hanozet, G. 1987. Preparation and partial characterisation of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp. Biochem. Physiol.* **86**: 301-308.

Wu, S.J. and Dean D.H. 1996. Functional significance of loops in the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* CryIII A α -endotoxin. *J. Mol. Biol.* **255** : 628-640

Revendications

- 1- Protéine Cry modifiée sensible à la pepsine, caractérisée en ce qu'elle possède au moins un site de coupure par la pepsine additionnel
- 2- Protéine Cry modifiée selon la revendication 1, caractérisée en ce que le site de coupure par la pepsine additionnel est représenté par un résidu acide aminé choisi parmi les résidus leucine, phénylalanine ou acide glutamique
- 3- Protéine Cry modifiée selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée parmi les protéines Cry1, Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry16, Cry17, Cry19, ou Cry20
- 4- Protéine Cry modifiée selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle est une protéine Cry9C
- 5- Protéine Cry modifiée selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle est la protéine Cry9Ca1
- 6- Protéine Cry modifiée selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle possède au moins un site de coupure par la pepsine additionnel dans au moins une des boucles inter-hélices alpha du domaine I
- 7- Protéine Cry modifiée selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle possède au moins un site de coupure par la pepsine additionnel dans la boucle inter-hélices alpha reliant les hélices alpha 3 et 4 du domaine I
- 8- Protéine Cry modifiée selon l'une des revendications 5 à 7, caractérisée en ce qu'elle possède un site de coupure par la pepsine additionnel en position 164
- 9- Protéine Cry modifiée selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée parmi les protéines Cry dont les séquences sont représentées par les identificateurs SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:8

10- Protéine Cry modifiée selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que les sites de coupure par la pepsine additionnels sont introduits par substitution de résidus acide aspartique par des résidus acide glutamique, substitution de résidus tryptophane par des résidus phénylalanine, et substitution de résidus valine ou isoleucine par des résidus leucine

11- Protéine Cry modifiée selon la revendication 11, caractérisée en ce que le taux de substitutions que possède ladite protéine Cry est de 25 %

12- Procédé d'augmentation de la sensibilité à la pepsine des protéines Cry, caractérisé en ce que l'on introduit au moins un site de coupure par la pepsine additionnel dans lesdites protéines Cry

13- Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que le site de coupure par la pepsine additionnel introduit est représenté par un résidu acide aminé choisi parmi les résidus leucine, phénylalanine ou acide glutamique

14- Procédé selon l'une des revendications 12 ou 13, caractérisé en ce qu'il s'applique aux protéines Cry sélectionnées parmi les protéines Cry1, Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry16, Cry17, Cry19, ou Cry20

15- Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il s'applique à la protéine Cry9C

16- Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il s'applique à la protéine Cry9Ca1

17- Procédé selon l'une des revendications 12 à 16, caractérisé en ce qu'au moins un site de coupure par la pepsine additionnel est introduit dans au moins une des boucles inter-hélices alpha du domaine I desdites protéines Cry

18- Procédé selon l'une des revendications 12 à 17, caractérisé en ce qu'au moins un site de coupure par la pepsine additionnel est introduit dans la boucle inter-hélices alpha reliant les hélices alpha 3 et 4 du domaine I

19- Procédé selon l'une des revendications 16 à 18, caractérisé en ce qu'un site de coupure par la pepsine additionnel est introduit en position 164

10- Protéine Cry modifiée selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que les sites de coupure par la pepsine additionnels sont introduits par substitution de résidus acide aspartique par des résidus acide glutamique, substitution de résidus tryptophane par des résidus phénylalanine, et substitution de résidus valine ou isoleucine par des résidus leucine

11- Protéine Cry modifiée selon la revendication 10, caractérisée en ce que le taux de substitutions que possède ladite protéine Cry est de 25 %

12- Procédé d'augmentation de la sensibilité à la pepsine des protéines Cry, caractérisé en ce que l'on introduit au moins un site de coupure par la pepsine additionnel dans lesdites protéines Cry

13- Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que le site de coupure par la pepsine additionnel introduit est représenté par un résidu acide aminé choisi parmi les résidus leucine, phénylalanine ou acide glutamique

14- Procédé selon l'une des revendications 12 ou 13, caractérisé en ce qu'il s'applique aux protéines Cry sélectionnées parmi les protéines Cry1, Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry16, Cry17, Cry19, ou Cry20

15- Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il s'applique à la protéine Cry9C

16- Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il s'applique à la protéine Cry9Ca1

17- Procédé selon l'une des revendications 12 à 16, caractérisé en ce qu'au moins un site de coupure par la pepsine additionnel est introduit dans au moins une des boucles inter-hélices alpha du domaine I desdites protéines Cry

18- Procédé selon l'une des revendications 12 à 17, caractérisé en ce qu'au moins un site de coupure par la pepsine additionnel est introduit dans la boucle inter-hélices alpha reliant les hélices alpha 3 et 4 du domaine I

20- Procédé selon l'une des revendications 12 à 16, caractérisé en ce que les sites de coupure par la pepsine additionnels sont introduits par substitution de résidus acide aspartique par des résidus acide glutamique, substitution de résidus tryptophane par des résidus phénylalanine, et substitution de résidus valine ou isoleucine par des résidus leucine

21- Procédé selon la revendication 20, caractérisé en ce que le taux de substitution que possède ladite protéine Cry est inférieur ou égal à 25 %

22- Polynucléotide codant une protéine Cry modifiée selon l'une des revendications 1 à 11

23- Gène chimère comprenant au moins, liés entre eux de manière opérationnelle:

- (a) un promoteur fonctionnel dans un organisme hôte
- (b) un polynucléotide selon la revendication 22
- (c) un élément terminateur fonctionnel dans un organisme hôte

24- Gène chimère selon la revendication 23, caractérisé en ce que le promoteur et l'élément terminateur sont fonctionnels dans les plantes

25- Vecteur d'expression ou de transformation contenant un gène chimère selon l'une des revendications 23 ou 24

26- Vecteur selon la revendication 27, caractérisé en ce qu'il est un plasmide, un phage ou un virus

27- Organisme hôte transformé avec l'un des vecteurs selon l'une des revendications 25 ou 26

28- Organisme hôte selon la revendication 27, caractérisé en ce qu'il est une plante

29- Plante selon la revendication 28, caractérisée en ce qu'elle contient, en plus d'un gène chimère selon l'une des revendications 23 ou 24, au moins un autre gène chimère contenant un polynucléotide codant pour une protéine d'intérêt

30- Partie d'une plante selon la revendication 29

19- Procédé selon l'une des revendications 16 à 18, caractérisé en ce qu'un site de coupure par la pepsine additionnel est introduit en position 164

20- Procédé selon l'une des revendications 12 à 16, caractérisé en ce que les sites de coupure par la pepsine additionnels sont introduits par substitution de résidus acide aspartique par des résidus acide glutamique, substitution de résidus tryptophane par des résidus phénylalanine, et substitution de résidus valine ou isoleucine par des résidus leucine

21- Procédé selon la revendication 20, caractérisé en ce que le taux de substitution que possède ladite protéine Cry est inférieur ou égal à 25 %

22- Polynucléotide codant une protéine Cry modifiée selon l'une des revendications 1 à 11

23- Gène chimère comprenant au moins, liés entre eux de manière opérationnelle:

- (a) un promoteur fonctionnel dans un organisme hôte
- (b) un polynucléotide selon la revendication 22
- (c) un élément terminateur fonctionnel dans un organisme hôte

24- Gène chimère selon la revendication 23, caractérisé en ce que le promoteur et l'élément terminateur sont fonctionnels dans les plantes

25- Vecteur d'expression ou de transformation contenant un gène chimère selon l'une des revendications 23 ou 24

26- Vecteur selon la revendication 25, caractérisé en ce qu'il est un plasmide, un phage ou un virus

27- Organisme hôte transformé avec l'un des vecteurs selon l'une des revendications 25 ou 26

28- Organisme hôte selon la revendication 27, caractérisé en ce qu'il est une plante

31- Graines d'une plante selon la revendication 29

32- Procédé de production des protéines Cry modifiées selon l'un des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes de:

(a) mise en culture d'un organisme hôte transformé selon l'invention dans un milieu de culture adapté à la croissance et à la multiplication dudit organisme

(b) extraction des protéines Cry produites par l'organisme transformé cultivé à l'étape (a)

33- Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce qu'il comprend une étape (c) de purification des protéines Cry extraites à l'étape (b)

34- Procédé selon l'une des revendications 32 ou 33, caractérisée en ce que l'organisme hôte est un microorganisme

35- Procédé selon la revendication 34, caractérisée en ce que l'organisme hôte est une bactérie *Bacillus thuringiensis*

36- Anticorps monoclonaux ou polyclonaux, caractérisés en ce qu'ils sont dirigés contre une protéine Cry modifiée selon l'une des revendications 1 à 11

29- Plante selon la revendication 28, caractérisée en ce qu'elle contient, en plus d'un gène chimère selon l'une des revendications 23 ou 24, au moins un autre gène chimère contenant un polynucléotide codant pour une protéine d'intérêt

30- Partie d'une plante selon la revendication 29

31- Graines d'une plante selon la revendication 29

32- Procédé de production des protéines Cry modifiées selon l'un des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes de:

(a) mise en culture d'un organisme hôte transformé selon la revendication 27 dans un milieu de culture adapté à la croissance et à la multiplication dudit organisme

(b) extraction des protéines Cry produites par l'organisme transformé cultivé à l'étape (a)

33- Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce qu'il comprend une étape (c) de purification des protéines Cry extraites à l'étape (b)

34- Procédé selon l'une des revendications 32 ou 33, caractérisée en ce que l'organisme hôte est un microorganisme

35- Procédé selon la revendication 34, caractérisée en ce que l'organisme hôte est une bactérie *Bacillus thuringiensis*

36- Anticorps monoclonaux ou polyclonaux, caractérisés en ce qu'ils sont dirigés contre une protéine Cry modifiée selon l'une des revendications 1 à 11

1/9

atgaatcgaa ataatacaaaa tgaatatgaa attattgaag cccccattg
 tgggtgtcca tcagaagaag aattaaggta tcctttggca agtgaaccaa
 atgcagcgtt acaaaatatg aactataaag aatacttaca aatgacagaa
 gaggaatata ctgaatctta tataaatcct agtttatcta ttagtggtag
 agaagcatta cagactgcgc ttactgttat taggagaata ctcggggctt
 taggtttacc gttttctgga caaatattaa gtttttatca attcctttta
 aatacactgt ttccattaaa tgaacacagct atatttgaag ctttcatgcg
 acagtttagag gaacttttaa atcaacaaat aacagaattt gcaagaaatc
 aggcacttgc aagattgcaa ggattaggag aatcttttaa ttatatcaa
 cggtcccttc aaaatttttt ggctgaacga aatgaaacac gaaatttaag
 ttattacgt gctcaattta tagctttaga acttgaattt ttaaattgcta
 ttccattggt tgcattaaat ggacagcagt taccattact gtcattatat
 gcacaagctt taaatttaca ttgtttatta ttaaagaag catctctttt
 tggagaagga ttggattca cacaggggga aatttccaca tattatgaac
 gtcaattgga actaaccgct aagtacacta attactgtga aactttttat
 aatacaggtt tagaacgttt aagaggaaca aatactgaaa gttttttaag
 atatcatcaa ttccgtagag aatgacttt attattatta gaattattag
 cgctatttcc atattatgaa ttacgacttt atccaacggg atcaaaccga
 cagcttacac gtgagttata tacagaaccg attttattta atccaccagc
 taatttagga ctttgccgac gttttgttac taatccctat aatacttttt
 ctgagctoga aaatgccttc attcgccac cacatctttt tgaaaggctg
 aatagcttaa caatcagcag taatcgattt ccattatcat ctaattttat
 ggaatatttt tcaggacata cgttacgccg tagttatctg aacgaatcag
 cattacaaga agaaagtat ggctaatta caaccacaag agcaacaatt
 aatccggat tagaagggaac aaaccgata gagtcaacgg cattagaatt

FIG 1

tcgttctgca ttagataggta tatatggctt aaatagagct tcttttttac
caggaggctt gtttaatggt asgacttctc ctgctaalgg aggalglaga
gaactctatg aaacaaatga agaaltacca ccagaagaaa gtaccggaag
ttcaacccat agactatctc atttaacctt ttttagcttt caaactaatc
aggetggatc tatagctaatt gcaggaagtt **tacctactta tttatttacc**
cgctcgt**gaat tagaacttaa** taatacgatt accccaaata gaattacaca
attaccattg **ttaaaggcat** clgcacct**tt atcggttact** acgttatlaa
aagggtccagg attlacagga ggggggtatac tccgaagaac aactaatggc
acatttggaa cgттаagatt **aacgttaa**at tcaccattaa cacaacaata
tcgcctaaga **ttacgttttg** cctcaacagg aaatttcagt ataagg**ttac**
tcggtggagg **gttatctatc** ggt**gaattaa** gattagggag cacaatgaac
agagggcagg aactaactta cgaatccttt ttcacaagag agtttactac
tactggtccg ttcaatccgc cttttacatt tacacaagct caagagattc
taacatt**aaa** tgcagaaggt **ttaagcaccg** gtggtgaata ttatatag**aa**
agaattgaaa **ttttacctt** **aaatccggca** cgagaagcgg aagagg**gaatt**
agaagcggcg aagaaagcg

FIG 1 (Suite)

3/9

MNRNNQNEYE IIEAPHCGCP SEELRYPLA SEPNAALQNM NYKEYLQMT
EETESYINP SLSISGREAL QTALTLLGRI LGALGLPFSG QILSFYQELL
NTLFPLNETA IFEAFMRQLE ELLNQQITEF ARNQALARLO GLGESFNLYQ
RSLQNFLEAER NETRNLSSLR AQFIALELEF LNAIPLFALN GQQLPLLSLY
AQALNLHLLL LKEASLFEGEG FGFTQGEIST YYERQLELTA KYTNYCETFY
NTGLERLRGT NTESFLRYHQ ERREMTLLLL ELLALFPYYE LRLYPTGSNP
QLTRELYTEP ILFNPPANLG LCRRFGTNPY NTFSELENAF IRPPHLFERL
NSLTISSNRF PLSSNFMEYF SGHTLRRSYL NESALQEESY GLITTTTRATI
NPGLEGTNRI ESTALEFRSA LIGIYGLNRA SFLPGGLFNG TTSPANGGCR
ELYETNEELP PEESTGSSTH RLSHLTFFSF QTNQAGSIAN AGSLPTYLET
RRELELNNTI TPNRITQLPL LKASAPLSGT TLLKGPGFTG GGILRRTTNG
TFGTLRLTLN SPLTQQYRLR LRFASTGNFS IRLLRGGLSI GELRLGSTMN
RGQELTYESF FTREFTTTGP FNPPFTTQA QEILTLNAEG LSTGGEYYIE
RIEILPLNPA REAEEEELEAA KKA

FIG 2

Oligonucléotide n°53 : tgaatatgaaattattgaagccccccattg
Oligonucléotide n°54 : tgggtgtccatcagaagaagaattaaggtatcctttggca
Oligonucléotide n°55 : tcctttggcaagtgaaccaaatagcagc
Oligonucléotide n°56 : gaactataaagaatacttacaaatg
Oligonucléotide n°57 : caaatgacagaagaggaatacactga
Oligonucléotide n°58 : tacactgaatccttatataaa
Oligonucléotide n°59 : tattagtggtagagaagcattacagactgcgcttac
Oligonucléotide n°60 : cagactgcgcttactgttattaggagaataactcggg
Oligonucléotide n°61 : gggcttttaggtttaccgtttttctgg
Oligonucléotide n°62 : ttctggacaaatattaagtttttatcaa
Oligonucléotide n°63 : cttttaatacactgtttccattaaatgaaacagctatat
Oligonucléotide n°64 : acagctatatttgaagctttcatg
Oligonucléotide n°65 : ctttcatgacagcttagaggaactt
Oligonucléotide n°66 : gaggaacttttaaatcaacaaataac
Oligonucléotide n°67 : ggattaggagaatccttttaat
Oligonucléotide n°68 : tcttttaatttatatcaacgttc
Oligonucléotide n°69 : ccttcaaaattttttggctga
Oligonucléotide n°70 : ttggctgaacgaaatga
Oligonucléotide n°71 : cgaaatgaaacacgaaatttaag
Oligonucléotide n°72 : acacgaaatttaagttattacgtgctcaatttatag
Oligonucléotide n°73 : gctcaatttatagcttttagaacttgaatttttaaatgctattccattg
Oligonucléotide n°74 : ccattgtttgcattaaatggacagcag
Oligonucléotide n°75 : aatggacagcagttaccattactgtca
Oligonucléotide n°76 : ccattactgtcattatatgcacaagct
Oligonucléotide n°77 : tatgcacaagctttaaatttacattt
Oligonucléotide n°78 : ttattaaaagaagcatctctttt
Oligonucléotide n°79 : tggagaaggatttggattcacacag
Oligonucléotide n°80 : cacatattatgaacgtcaattgga

FIG 3

Oligonucléotide n°81 : tactgtgaaactttttataatacaggtt
Oligonucléotide n°82 : tacaggtttagaacgtttaagagga
Oligonucléotide n°83 : aatactgaaagttttttaagatatcatc
Oligonucléotide n°84 : gtagagaaatgactttattattattagaattattagcgctatttccatatt
Oligonucléotide n°85 : tttccatattatgaattacgactttatccaac
Oligonucléotide n°86 : cttacacgtgagttatatacaga
Oligonucléotide n°87 : tatacagaaccgattttattttaatccacc
Oligonucléotide n°88 : ccaccagctaatttaggactttgccgac
Oligonucléotide n°89 : ctttgccgacgttttggtactaatccc
Oligonucléotide n°90 : catctttttgaaaggctgaatag
Oligonucléotide n°91 : taatcgatttccattatcatctaattttat
Oligonucléotide n°92 : ctaattttatggaatattttcaggacatacggtac
Oligonucléotide n°93 : tagttatctgaacgaatcagcattacaagaaga
Oligonucléotide n°94 : caagaagaaagttatggcct
Oligonucléotide n°95 : caattaatcccggattagaaggaacaaaccgcata
Oligonucléotide n°96 : gagtcaacggcattagaatttcggttctgca
Oligonucléotide n°97 : ggtatatatggcttaaataagagcttc
Oligonucléotide n°98 : tagagcttctttttaccaggaggcttggt
Oligonucléotide n°99 : ctgctaattggaggatgtagagaactctatga
Oligonucléotide n°100 : ctctatgaaacaaatga
Oligonucléotide n°101 : acaaatgaagaattaccacc
Oligonucléotide n°102 : attaccaccagaagaaagtaccggaag
Oligonucléotide n°103 : agactatctcatttaaccttttttagcttt
Oligonucléotide n°104 : gctaattgcaggaagttacctacttat
Oligonucléotide n°105 : cctacttatttatttaccgctcgtga
Oligonucléotide n°106 : acccgctcgtgaattagaacttaataatacgatt
Oligonucléotide n°107 : attaccattgttaaaggcatctgc
Oligonucléotide n°108 : aaggcatctgcaccttatcggtactacg

FIG 3 (suite)

Oligonucléotide n°109 : tcgggtactacg**tt**attaaaaggtccagg
Oligonucléotide n°110 : acatttggaacg**tt**aagatt**aa**cg**tt**aaattcaccattaa
Oligonucléotide n°111 : cacaacaatatcg**c**ctaagatt**ac**g**l**tttgcctcaac
Oligonucléotide n°112 : aaatttcagtataagg**tt**actccgtggaggg
Oligonucléotide n°113 : ctccgtggaggg**tt**atctatcggtga
Oligonucléotide n°114 : tctatcggtga**att**aagattaggagcac
Oligonucléotide n°115 : caagagattctaacatt**aa**atgcagaaggt
Oligonucléotide n°116 : aatgcagaaggt**tt**aagcaccggtggtgaata
Oligonucléotide n°117 : gtggtgaatattatataga**aa**gaattgaaatt
Oligonucléotide n°118 : agaattgaaatt**tt**ac**ct****tt**aaatccggcacgagaag
Oligonucléotide n°119 : cgagaagcggaagagga**att**agaagcggcg

FIG 3 (suite)

7/9

atgaatcgaa ~~ata~~aatcaaaa tgaatatgaa attattgatg cccccattg
 tgggtgtcca tcagatgacg atgtgagga tcctttggca agtgacccaa
 atgcagcgtt acaaaatatg aactataaag attacttaca aatgacagat
 gaggactaca ctgattctta tataaatcct agtttatcta ttagtggtag
 agatgcagtt cagactgcg ttaactgttat taggagaata ctcggggctt
 taggtgttcc gttttctgga caaatattaa gtttttatca attcctttta
 aatacactgt ggccagttaa tgatacagct atatgggaag ctttcatgcg
 acaggtggag gaacttgtca atcaacaaat aacagaattt gcaagaaatc
 aggcacttgc aagattgcaa ggattaggag aatcttttaa tgtatatcaa
 cgttcccttc aaaattgggt ggctgatcga aatgatacac gaaatttaag
 tttattacgt gctcaattta tagctttaga ccttgatttt gttaatgcta
 ttccattggt tgcagtaa at ggacagcagg ttccattact gtcagtatat
 gcacaagctt ~~t~~aaatttaca tttgttatta ttaaagaag catctctttt
 tggagaagga tggggattca cacaggggga aatttcaca tattatgaac
 gtcaattgga actaacgct aagtaacta attactgtga aacttggtat
 aatacaggtt tagaacgttt aagaggaaca aatactgaaa gttttttaag
 atatcatcaa ttccgtagag aaatgacttt agtggtatta gatgttggtg
 cgctatttcc atattatgat gtacgacttt atccaacggg atcaaacca
 cagcttacac gtgaggtata tacagatccg attgtattta atccaccagc
 taatttagga ctttgccgac gttgggttac taatccctat aatacttttt
 ctgagctcga aaatgccttc attcgccac cacatctttt tgaaaggctg
 aatagcttaa caatcagcag taatcgattt ccagtttcat ctaattttat
 ggaatatttt tcaggacata cgttacgccc tagttatctg aacgattcag
 cagtacaaga agatagttat ggctaatta caaccacaag agcaacaatt
 aatcccgag ttgatggaac aaaccgcata gagtcaacgg cattagaatt
 tegtcttcca ttgataggtata tatatggctt aaatagagct tctttgtcc
 caggaggctt gtttaatggt acgacttctc ctgctaattg aggatgtaga
 gatctctatg atacaaatga tgaattacca ccagatgaaa gtaccggaag

FIG 4

ttcaaacccat agactatctc atttaacctt ttttagcttt caaactaatc
aggctggatc tatagctaal gcaggaagtg tacctactta tgtttggacc
cgctgtgatg tggaccttaa taatacgatt accccaaata gaattacaca
attaccattg glaaaggcat ctgcacctgt ttgggttact accgtcttaa
aaggctccagg atttacagga ggggggtatac tccgaagaac aactaatggc
acattttggaa cgtaagagt aacggttaat tcaccattaa cacaacaata
tcgcctaaga ttacglttttg cctcaacagg aaatttcagt ataagggtac
tcggtggagg ggtttctatc ggtgatgtta gattagggag cacaatgaac
agagggcagg aactaactta cgaatccttt ttcacaagag agtttactac
tactggtccg ttcaatccgc cttttacatt tacacaagct caagagattc
taacagtga aacagaaggt gttagcaccg gtggtgaata ttatatagat
agaattgaaa ttgtccctgt gaatccggca cgagaagcgg aagaggattt
agaagcggcg aagaaagcg

FIG 4 (suite)

MNRNNQNEYE IIDAPHCGCP SDDDVRYPLA SDPNAALQNM NYKDYLQMTD
EDYTDSYINP SLSISGRDAV QTALTLLGRI LGALGVPFSG QILSFYQFLL
NTLWPVNDTA IWEAFMRQVE ELVNQQITEF ARNQALARLQ GLGESFNVYQ
RSLQNLWADR NDTRNLSLLR AQFIALDLDF VNAIPLFAVN GQQVPLLSVY
AQALNLHLLL LKEASLFEGEG WGFTQGEIST YYERQLELTA KYTNYCETWY
NTGLERLRGT NTESFLRYHQ FRREMTLVVL DVVALFPYYD VRLYPTGSDP
QLTREVTDP IVFNPPANLG LCRRWGTPY NTFSELENAF IRPPHLFERL
NSLTISSNRF PVSSNMEYF SGHTLRRSYL NDSAVQEDSY GLITTTTRATI
NPGVDGTNRI ESTALEFRSA LIGIYGLNRA SFVPGGLFNG TTSPANGGCR
DLYDTNDELP PDESTGSSSTH RLSHLTFFSF QTNQAGSIAN AGSVPTYVWT
RRDVDLNNTI TPNRITQLPL VKASAPVSGT TVLKGPFTG GGILRRTTNG
TFGTLRVTVN SPLTQQYRLR LRFASTGNFS IRVLRGGVSI GDVRLGSTMN
RGQELTYESF FTREFTTTGP FNPPFTTQA QEILTVNAEG VSTGGEYYID
RIEIVPVNPA REAEEDLEAA KKA

FIG 5

LISTE DE SEQUENCES

<110> Aventis CropScience SA

<120> Toxine insecticide de Bacillus thuringiensis modifiée
sensible à la pepsine

<130> PRO 01002

<140>

<141>

<160> 160

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2019

<212> ADN

<213> Bacillus thuringiensis

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2019)

<400> 1

atg aat cga aat aat caa aat gaa tat gaa att att gat gcc ccc cat	48
Met Asn Arg Asn Asn Gln Asn Glu Tyr Glu Ile Ile Asp Ala Pro His	
1 5 10 15	
tgt ggg tgt cca tca gat gac gat gtg agg tat cct ttg gca agt gac	96
Cys Gly Cys Pro Ser Asp Asp Val Arg Tyr Pro Leu Ala Ser Asp	
20 25 30	
cca aat gca gcg tta caa aat atg aac tat aaa gat tac tta caa atg	144
Pro Asn Ala Ala Leu Gln Asn Met Asn Tyr Lys Asp Tyr Leu Gln Met	
35 40 45	
aca gat gag gac tac act gat tct tat ata aat cct agt tta tct att	192
Thr Asp Glu Asp Tyr Thr Asp Ser Tyr Ile Asn Pro Ser Leu Ser Ile	
50 55 60	
agt ggt aga gat gca gtt cag act gcg ctt act gtt gtt ggg aga ata	240
Ser Gly Arg Asp Ala Val Gln Thr Ala Leu Thr Val Val Gly Arg Ile	
65 70 75 80	
ctc ggg gct tta ggt gtt ccg ttt tct gga caa ata gtg agt ttt tat	288
Leu Gly Ala Leu Gly Val Pro Phe Ser Gly Gln Ile Val Ser Phe Tyr	
85 90 95	
caa ttc ctt tta aat aca ctg tgg cca gtt aat gat aca gct ata tgg	336
Gln Phe Leu Leu Asn Thr Leu Trp Pro Val Asn Asp Thr Ala Ile Trp	
100 105 110	
gaa gct ttc atg cga cag gtg gag gaa ctt gtc aat caa caa ata aca	384
Glu Ala Phe Met Arg Gln Val Glu Glu Leu Val Asn Gln Gln Ile Thr	
115 120 125	
gaa ttt gca aga aat cag gca ctt gca aga ttg caa gga tta gga gac	432
Gln Phe Ala Arg Asn Gln Ala Leu Ala Arg Leu Gln Gly Leu Gly Asp	
130 135 140	

tcc	tct	aat	gta	tat	caa	cgt	tcc	ctt	caa	aat	tgg	ttg	gct	gat	cga	480
Ser	Phe	Asn	Val	Tyr	Gln	Arg	Ser	Leu	Gln	Asn	Trp	Leu	Ala	Asp	Arg	
145					150					155					160	
aat	gat	aca	cga	aat	tta	agt	ggt	ggt	cgt	gct	caa	ttt	ata	gct	tta	528
Asn	Asp	Thr	Arg	Asn	Leu	Ser	Val	Val	Arg	Ala	Gln	Phe	Ile	Ala	Leu	
				165					170					175		
gac	ctt	gat	ttt	ggt	aat	gct	att	cca	ttg	ttt	gca	gta	aat	gga	cag	576
Asp	Leu	Asp	Phe	Val	Asn	Ala	Ile	Pro	Leu	Phe	Ala	Val	Asn	Gly	Gln	
			180					185					190			
cag	ggt	cca	tta	ctg	tca	gta	tat	gca	caa	gct	gtg	aat	tta	cat	ttg	624
Gln	Val	Pro	Leu	Leu	Ser	Val	Tyr	Ala	Gln	Ala	Val	Asn	Leu	His	Leu	
		195					200					205				
tta	tta	tta	aaa	gat	gca	tct	ctt	ttt	gga	gaa	gga	tgg	gga	ttc	aca	672
Leu	Leu	Leu	Lys	Asp	Ala	Ser	Leu	Phe	Gly	Glu	Gly	Trp	Gly	Phe	Thr	
210						215					220					
cag	ggg	gaa	att	tcc	aca	tat	tat	gac	cgt	caa	ttg	gaa	cta	acc	gct	720
Gln	Gly	Glu	Ile	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asp	Arg	Gln	Leu	Glu	Leu	Thr	Ala	
225				230					235					240		
aag	tac	act	aat	tac	tgt	gaa	act	tgg	tat	aat	aca	ggt	tta	gat	cgt	768
Lys	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Cys	Glu	Thr	Trp	Tyr	Asn	Thr	Gly	Leu	Asp	Arg	
			245					250					255			
tta	aga	gga	aca	aat	act	gaa	agt	tgg	tta	aga	tat	cat	caa	ttc	cgt	816
Leu	Arg	Gly	Thr	Asn	Thr	Glu	Ser	Trp	Leu	Arg	Tyr	His	Gln	Phe	Arg	
			260					265				270				
aga	gaa	atg	act	tta	gtg	gta	tta	gat	ggt	gtg	gag	cta	ttt	cca	tat	864
Arg	Glu	Met	Thr	Leu	Val	Val	Leu	Asp	Val	Val	Ala	Leu	Phe	Pro	Tyr	
		275				280						285				
tat	gat	gta	cga	ctt	tat	cca	acg	gga	tca	aac	cca	cag	ott	aca	cgt	912
Tyr	Asp	Val	Arg	Leu	Tyr	Pro	Thr	Gly	Ser	Asn	Pro	Gln	Leu	Thr	Arg	
290						295					300					
gag	gta	tat	aca	gat	cgg	att	gta	ttt	aat	cca	cca	gct	aat	ggt	gga	960
Glu	Val	Tyr	Thr	Asp	Pro	Ile	Val	Phe	Asn	Pro	Pro	Ala	Asn	Val	Gly	
305				310					315					320		
ctt	tgc	cga	cgt	tgg	ggt	act	aat	ccc	tat	aat	act	ttt	tct	gag	ctc	1008
Leu	Cys	Arg	Arg	Trp	Gly	Thr	Asn	Pro	Tyr	Asn	Thr	Phe	Ser	Glu	Leu	
			325					330					335			
gaa	aat	gac	ttc	att	cgc	cca	cca	cat	ctt	ttt	gat	agg	ctg	aat	agc	1056
Gln	Asn	Ala	Phe	Ile	Arg	Pro	Pro	His	Leu	Phe	Asp	Arg	Leu	Asn	Ser	
		340						345				350				
tta	aaa	atc	agc	agt	aat	cga	ttt	cca	ggt	tca	tct	aat	ttt	atg	gat	1104
Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Asn	Arg	Phe	Pro	Val	Ser	Ser	Asp	Phe	Met	Asp	
		355					360					365				
tat	tac	tca	gga	cat	acc	ttt	cgc	cgt	agt	tat	ctg	aac	gat	tca	gca	1152
Tyr	Tyr	Ser	Gly	His	Thr	Leu	Arg	Arg	Ser	Tyr	Leu	Asn	Asp	Ser	Ala	
370						375					380					

gta	caa	gaa	gat	agt	tat	ggc	cta	att	aca	acc	aca	aga	gca	aca	att	1200	
Val	Gln	Glu	Asp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Ile	Thr	Thr	Thr	Arg	Ala	Thr	Ile		
235					390					395					400		
aat	ccc	gga	gtt	gat	gga	aca	aac	cgc	ata	gag	tca	acg	gca	gta	gat	1248	
Asn	Pro	Gly	Val	Asp	Gly	Thr	Asn	Arg	Ile	Glu	Ser	Thr	Ala	Val	Asp		
				405				410						415			
ttt	cgt	tct	gca	tig	ata	ggg	ata	tat	ggc	gtg	aat	aga	gct	tct	ttt	1296	
Phe	Arg	Ser	Ala	Leu	Ile	Gly	Ile	Tyr	Gly	Val	Asn	Arg	Ala	Ser	Phe		
			420					425					430				
gtc	cca	gga	ggc	tig	ttt	aat	ggg	acg	act	tct	cct	gct	aat	gga	gga	1344	
Val	Pro	Gly	Gly	Leu	Phe	Asn	Gly	Thr	Thr	Ser	Pro	Ala	Asn	Gly	Gly		
		435					440					445					
tgt	aga	gat	ctc	tat	gat	aca	aat	gat	gaa	tta	cca	cca	gat	gaa	agt	1392	
Cys	Arg	Asp	Leu	Tyr	Asp	Thr	Asn	Asp	Glu	Leu	Pro	Pro	Asp	Glu	Ser		
	450					455					460						
acc	gga	agt	tca	acc	cat	aga	cta	tct	cat	gtt	acc	ttt	ttt	agc	ttt	1440	
Thr	Gly	Ser	Ser	Thr	His	Arg	Leu	Ser	His	Val	Thr	Phe	Phe	Ser	Phe		
465					470					475					480		
caa	act	aat	cag	gct	gga	tct	ata	gct	aat	gca	gga	agt	gta	cct	act	1488	
Gln	Thr	Asn	Gln	Ala	Gly	Ser	Ile	Ala	Asn	Ala	Gly	Ser	Val	Pro	Thr		
			485					490						495			
tat	gtt	tgg	acc	cgt	cgt	gat	gtg	gac	ctt	aat	aat	acg	att	acc	cca	1536	
Tyr	Val	Trp	Thr	Arg	Arg	Asp	Val	Asp	Leu	Asn	Asn	Thr	Ile	Thr	Pro		
			500					505					510				
aat	aga	att	aca	caa	tta	cca	tig	gta	aag	gca	tct	gca	cct	gtt	tgc	1584	
Asn	Arg	Ile	Thr	Gln	Leu	Pro	Leu	Val	Lys	Ala	Ser	Ala	Pro	Val	Ser		
		515					520					525					
ggt	act	acg	gtc	tta	aaa	ggg	cca	gga	ttt	aca	gga	ggg	ggg	ggt	ata	ctc	1632
Gly	Thr	Thr	Val	Leu	Lys	Gly	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Ile	Leu	
	530					535						540					
caa	aga	aca	act	aat	ggc	aca	ttt	gga	acg	tta	aga	gta	acg	gtt	aat	1680	
Arg	Arg	Thr	Thr	Asn	Gly	Thr	Phe	Gly	Thr	Leu	Arg	Val	Thr	Val	Asn		
545					550					555					560		
cca	cca	tta	aca	caa	caa	tat	cgc	cta	aga	gtt	cgt	ttt	gac	tca	aca	1728	
Ser	Pro	Leu	Thr	Gln	Gln	Tyr	Arg	Leu	Arg	Val	Arg	Phe	Ala	Ser	Thr		
				565				570						575			
gga	aat	ttc	agt	ata	agg	gta	ctc	cgt	gga	ggg	gtt	tct	atc	ggg	gat	1776	
Gly	Asn	Phe	Ser	Ile	Arg	Val	Leu	Arg	Gly	Gly	Val	Ser	Ile	Gly	Asp		
			580					585					590				
ttt	aga	tta	ggg	agg	aca	atc	aac	aga	ggg	cag	gaa	cta	act	tac	qaa	1824	
Val	Arg	Leu	Gly	Ser	Thr	Met	Asn	Arg	Gly	Gln	Glu	Leu	Thr	Tyr	Glu		
		595					600					605					
aat	ttt	ttc	aca	gaa	cag	tta	act	act	act	ggg	cag	tta	aat	cgg	cct	1872	
Asn	Thr	Phe	Thr	Arg	Glu	Phe	Thr	Thr	Thr	Gly	Pro	Phe	Asn	Pro	Pro		
		610				615											
ttt	aca	ttt	aca	caa	gct	caa	gag	att	cta	aca	gtg	aat	gca	gaa	ggg	1920	

Phe Thr Phe Thr Gln Ala Gln Glu Ile Leu Thr Val Asn Ala Glu Gly
625 630 635 640

gtt agc acc ggt ggt gaa tat tat ata gat aga att gaa att gtc cct 1968
Val Ser Thr Gly Gly Glu Tyr Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Ile Val Pro
645 650 655

gtg aat ccg gca cga gaa gcg gaa gag gat tta gaa gcg gcg aag aaa 2016
Val Asn Pro Ala Arg Glu Ala Glu Glu Asp Leu Glu Ala Ala Lys Lys
660 665 670

gcg 2019
Ala

<210> 2

<211> 673

<212> PRT

<213> Bacillus thuringiensis

<400> 2

Met Asn Arg Asn Asn Gln Asn Glu Tyr Glu Ile Ile Asp Ala Pro His
1 5 10 15

Cys Gly Cys Pro Ser Asp Asp Asp Val Arg Tyr Pro Leu Ala Ser Asp
20 25 30

Pro Asn Ala Ala Leu Gln Asn Met Asn Tyr Lys Asp Tyr Leu Gln Met
35 40 45

Thr Asp Glu Asp Tyr Thr Asp Ser Tyr Ile Asn Pro Ser Leu Ser Ile
50 55 60

Ser Gly Arg Asp Ala Val Gln Thr Ala Leu Thr Val Val Gly Arg Ile
65 70 75 80

Leu Gly Ala Leu Gly Val Pro Phe Ser Gly Gln Ile Val Ser Phe Tyr
85 90 95

Gln Phe Leu Leu Asn Thr Leu Trp Pro Val Asn Asp Thr Ala Ile Trp
100 105 110

Glu Ala Phe Met Arg Gln Val Glu Glu Leu Val Asn Gln Gln Ile Thr
115 120 125

Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala Leu Ala Arg Leu Gln Gly Leu Gly Asp
130 135 140

Ser Phe Asn Val Tyr Gln Arg Ser Leu Gln Asn Trp Leu Ala Asp Arg
145 150 155 160

Asn Asp Thr Arg Asn Leu Ser Val Val Arg Ala Gln Phe Ile Ala Leu
165 170 175

Asp Leu Asp Phe Val Asn Ala Ile Pro Leu Phe Ala Val Asn Gly Gln
180 185 190

Gln Val Pro Leu Leu Ser Val Tyr Ala Gln Ala Val Asn Leu His Leu
195 200 205

Leu Leu Leu Lys Asp Ala Ser Leu Phe Gly Glu Gly Trp Gly Phe Thr

210	215	220
Gln Gly Glu Ile Ser Thr Tyr Tyr Asp Arg Gln Leu Glu Leu Thr Ala		
225	230	235
Lys Tyr Thr Asn Tyr Cys Glu Thr Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Asp Arg		
	245	250
Leu Arg Gly Thr Asn Thr Glu Ser Trp Leu Arg Tyr His Gln Phe Arg		
	260	265
Arg Glu Met Thr Leu Val Val Leu Asp Val Val Ala Leu Phe Pro Tyr		
	275	285
Tyr Asp Val Arg Leu Tyr Pro Thr Gly Ser Asn Pro Gln Leu Thr Arg		
	295	300
Glu Val Tyr Thr Asp Pro Ile Val Phe Asn Pro Pro Ala Asn Val Gly		
305	310	315
Leu Cys Arg Arg Trp Gly Thr Asn Pro Tyr Asn Thr Phe Ser Glu Leu		
	325	330
Glu Asn Ala Phe Ile Arg Pro Pro His Leu Phe Asp Arg Leu Asn Ser		
	340	345
Leu Thr Ile Ser Ser Asn Arg Phe Pro Val Ser Ser Asn Phe Met Asp		
	355	360
Tyr Trp Ser Gly His Thr Leu Arg Arg Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Ala		
	375	380
Val Gln Glu Asp Ser Tyr Gly Leu Ile Thr Thr Thr Arg Ala Thr Ile		
385	390	395
Asn Pro Gly Val Asp Gly Thr Asn Arg Ile Glu Ser Thr Ala Val Asp		
	405	410
Phe Arg Ser Ala Leu Ile Gly Ile Tyr Gly Val Asn Arg Ala Ser Phe		
	420	425
Val Pro Gly Gly Leu Phe Asn Gly Thr Thr Ser Pro Ala Asn Gly Gly		
	435	440
Cys Arg Asp Leu Tyr Asp Thr Asn Asp Glu Leu Pro Pro Asp Glu Ser		
	450	455
Thr Gly Ser Ser Thr His Arg Leu Ser His Val Thr Phe Phe Ser Phe		
	470	475
Gln Thr Asn Gln Ala Gly Ser Ile Ala Asn Ala Gly Ser Val Pro Thr		
	485	490
Tyr Val Trp Thr Arg Arg Asp Val Asp Leu Asn Asn Thr Ile Thr Pro		
	500	505
Asn Arg Ile Thr Gln Leu Pro Leu Val Lys Ala Ser Ala Pro Val Ser		
	515	520
Gly Thr Thr Val Leu Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Gly Ile Leu		
	535	540

Arg Arg Thr Thr Asn Gly Thr Phe Gly Thr Leu Arg Val Thr Val Asn
545 550 555 560

Ser Pro Leu Thr Gln Gln Tyr Arg Leu Arg Val Arg Phe Ala Ser Thr
565 570 575

Gly Asn Phe Ser Ile Arg Val Leu Arg Gly Gly Val Ser Ile Gly Asp
580 585 590

Val Arg Leu Gly Ser Thr Met Asn Arg Gly Gln Glu Leu Thr Tyr Glu
595 600 605

Ser Phe Phe Thr Arg Glu Phe Thr Thr Thr Gly Pro Phe Asn Pro Pro
610 615 620

Phe Thr Phe Thr Gln Ala Gln Glu Ile Leu Thr Val Asn Ala Glu Gly
625 630 635 640

Val Ser Thr Gly Gly Glu Tyr Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Ile Val Pro
645 650 655

Val Asn Pro Ala Arg Glu Ala Glu Glu Asp Leu Glu Ala Ala Lys Lys
660 665 670

Ala

<210> 3

<211> 2019

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Cry9Cal Leu-164

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2019)

<400> 3

atg aat cga aat aat caa aat gaa tat gaa att att gat gcc ccc cat 48
Met Asn Arg Asn Asn Gln Asn Glu Tyr Glu Ile Ile Asp Ala Pro His
1 5 10 15

tgt ggg tgt cca tca gat gac gat gtg agg tat cct ttg gca agt gac 96
Cys Gly Cys Pro Ser Asp Asp Asp Val Arg Tyr Pro Leu Ala Ser Asp
20 25 30

cca aat gca gcg tta caa aat atg aac tat aaa gat tac tta caa atg 144
Pro Asn Ala Ala Leu Gln Asn Met Asn Tyr Lys Asp Tyr Leu Gln Met
35 40 45

aca gat gag gac tac aat gat tat ata aat cct agt tta tct att 192
Thr Asp Glu Asp Tyr Thr Asp Ser Tyr Ile Asn Pro Ser Leu Ser Ile
50 55 60

agt ggt aga gat cca gtt cag aat gcg ctt act gtt gtt ggg aga ata 240
Ser Gly Arg Asp Ala Val Gln Thr Ala Leu Thr Val Val Gly Arg Ile

1er dépôt

7

65	70	75	80	
ctc ggg gct tta ggt gtt ccg ttt tct gga caa ata gtg agt ttt tat				288
Leu Gly Ala Leu Gly Val Pro Phe Ser Gly Gln Ile Val Ser Phe Tyr	85	90	95	
caa ttc ctt tta aat aca ctg tgg cca gtt aat gat aca gct ata tgg				336
Gln Phe Leu Leu Asn Thr Leu Trp Pro Val Asn Asp Thr Ala Ile Trp	100	105	110	
gaa gct ttc atg cga cag gtg gag gaa ctt gtc aat caa caa ata aca				384
Glu Ala Phe Met Arg Gln Val Glu Glu Leu Val Asn Gln Gln Ile Thr	115	120	125	
gaa ttt gca aga aat cag gca ctt gca aga ttg caa gga tta gga gac				432
Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala Leu Ala Arg Leu Gln Gly Leu Gly Asp	130	135	140	
tct ttt aat gta tat caa cgt tcc ctt caa aat tgg ttg gct gat cga				480
Ser Phe Asn Val Tyr Gln Arg Ser Leu Gln Asn Trp Leu Ala Asp Arg	145	150	155	160
aat gat aca tta aat tta agt gtt gtt cgt gct caa ttt ata gct tta				528
Asn Asp Thr Leu Asn Leu Ser Val Val Arg Ala Gln Phe Ile Ala Leu	165	170	175	
gac ctt gat ttt gtt aat gct att cca ttg ttt gca gta aat gga cag				576
Asp Leu Asp Phe Val Asn Ala Ile Pro Leu Phe Ala Val Asn Gly Gln	180	185	190	
cag gtt cca tta ctg tca gta tat gca caa gct gtg aat tta cat ttg				624
Gln Val Pro Leu Leu Ser Val Tyr Ala Gln Ala Val Asn Leu His Leu	195	200	205	
tta tta tta aaa gat gca tct ctt ttt gga gaa gga tgg gga ttc aca				672
Leu Leu Leu Lys Asp Ala Ser Leu Phe Gly Glu Gly Trp Gly Phe Thr	210	215	220	
cag ggg gaa att tcc aca tat tat gac cgt caa ttg gaa cta acc gct				720
Gln Gly Glu Ile Ser Thr Tyr Tyr Asp Arg Gln Leu Glu Leu Thr Ala	225	230	235	240
aag tac act aat tac tgt gaa act tgg tat aat aca ggt tta gat cgt				768
Lys Tyr Thr Asn Tyr Cys Glu Thr Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Asp Arg	245	250	255	
tta aga gga aca aat act gaa agt tgg tta aga tat cat caa ttc cgt				816
Leu Arg Gly Thr Asn Thr Glu Ser Trp Leu Arg Tyr His Gln Phe Arg	260	265	270	
aga gaa atg act tta gtg gta tta gat gtt gtg gcg cta ttt cca tat				864
Arg Glu Met Thr Leu Val Val Leu Asp Val Val Ala Leu Phe Pro Tyr	275	280	285	
tat gat gta cga ctt tat cca acg gga tca aac cca cag ctt aca cgt				912
Tyr Asp Val Arg Leu Tyr Pro Thr Gly Ser Asn Pro Gln Leu Thr Arg	290	295	300	
gaa gla tat aca gat ccg att gta ttt aat cca cca gct aat gtt gga				960
Glu Val Tyr Thr Asp Pro Ile Val Phe Asn Pro Pro Ala Asn Val Gly	305	310	315	320

ctt tgc cga cgt tgg ggt act aat ccc tat aat act ttt tct gag ctc Leu Cys Arg Arg Trp Gly Thr Asn Pro Tyr Asn Thr Phe Ser Glu Leu 325 330 335	1008
gaa aat gcc ttc att cgc cca cca cat ctt ttt gat agg ctg aat agc Glu Asn Ala Phe Ile Arg Pro Pro His Leu Phe Asp Arg Leu Asn Ser 340 345 350	1056
tta aca atc agc agt aat cga ttt cca gtt tca tct aat ttt atg gat Leu Thr Ile Ser Ser Asn Arg Phe Pro Val Ser Ser Asn Phe Met Asp 355 360 365	1104
tat tgg tca gga cat acg tta cgc cgt agt tat ctg aac gat tca gca Tyr Trp Ser Gly His Thr Leu Arg Arg Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Ala 370 375 380	1152
gta caa gaa gat agt tat ggc cta att aca acc aca aga gca aca att Val Gln Glu Asp Ser Tyr Gly Leu Ile Thr Thr Thr Arg Ala Thr Ile 385 390 395 400	1200
aat ccc gga gtt gat gga aca aac cgc ata gag tca acg gca gta gat Asn Pro Gly Val Asp Gly Thr Asn Arg Ile Glu Ser Thr Ala Val Asp 405 410 415	1248
ttt cgt tct gca ttg ata ggt ata tat ggc gtg aat aga gct tct ttt Phe Arg Ser Ala Leu Ile Gly Ile Tyr Gly Val Asn Arg Ala Ser Phe 420 425 430	1296
gtc cca gga ggc ttg ttt aat ggt acg act tct cct gct aat gga gga Val Pro Gly Gly Leu Phe Asn Gly Thr Thr Ser Pro Ala Asn Gly Gly 435 440 445	1344
tgt aga gat ctc tat gat aca aat gat gaa tta cca cca gat gaa agt Cys Arg Asp Leu Tyr Asp Thr Asn Asp Glu Leu Pro Pro Asp Glu Ser 450 455 460	1392
acc gga agt tca acc cat aga cta tct cat gtt acc ttt ttt agc ttt Thr Gly Ser Ser Thr His Arg Leu Ser His Val Thr Phe Phe Ser Phe 465 470 475 480	1440
caa act aat cag gct gga tct ata gct aat gca gga agt gta cct act Gln Thr Asn Gln Ala Gly Ser Ile Ala Asn Ala Gly Ser Val Pro Thr 485 490 495	1488
tat gtt tgg acc cgt cgt gat gtg gac ctt aat aat acg att acc cca Tyr Val Trp Thr Arg Arg Asp Val Asp Leu Asn Asn Thr Ile Thr Pro 500 505 510	1536
aat aga att aca caa tta cca ttg gta aag gca tct gca cct gtt tgc Asn Arg Ile Thr Gln Leu Pro Leu Val Lys Ala Ser Ala Pro Val Ser 515 520 525	1584
ggt act acg gtc tta aaa ggt cca gga ttt aca gga ggg ggt ata ctc Gly Thr Thr Val Leu Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Gly Ile Leu 530 535 540	1632
aga aga aca act aat ggc aca ttt gga acg tta aga gta acc gtt aat Arg Arg Thr Thr Asn Gly Thr Phe Gly Thr Leu Arg Val Thr Val Asn 545 550 555 560	1680

aca cca tta aca caa caa tat cgc cta aga gtt cgt ttt gcc tca aca 1728
 Ser Pro Leu Thr Gln Gln Tyr Arg Leu Arg Val Arg Phe Ala Ser Thr
 565 570 575

gga aat ttc agt ata agg gta ctc cgt gga ggg gtt tct atc ggt gat 1776
 Gly Asn Phe Ser Ile Arg Val Leu Arg Gly Gly Val Ser Ile Gly Asp
 580 585 590

gtt aga tta ggg agc aca atg aac aga ggg cag gaa cta act tac gaa 1824
 Val Arg Leu Gly Ser Thr Met Asn Arg Gly Gln Glu Leu Thr Tyr Glu
 595 600 605

tcc ttt ttc aca aga gag ttt act act act ggt ccg ttc aat ccg cct 1872
 Ser Phe Phe Thr Arg Glu Phe Thr Thr Thr Gly Pro Phe Asn Pro Pro
 610 615 620

ttt aca ttt aca caa gct caa gag att cta aca gtg aat gca gaa ggt 1920
 Phe Thr Phe Thr Gln Ala Gln Glu Ile Leu Thr Val Asn Ala Glu Gly
 625 630 635 640

gtt agc acc ggt ggt gaa tat tat ata gat aga att gaa att gtc cct 1968
 Val Ser Thr Gly Gly Glu Tyr Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Ile Val Pro
 645 650 655

gtg aat ccg gca cga gaa gcg gaa gag gat tta gaa gcg gcg aag aaa 2016
 Val Asn Pro Ala Arg Glu Ala Glu Glu Asp Leu Glu Ala Ala Lys Lys
 660 665 670

gcg 2019
 Ala

<210> 4

<211> 673

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle: Cry9Ca1 Leu-164

<400> 4

Met Asn Arg Asn Asn Gln Asn Glu Tyr Glu Ile Ile Asp Ala Pro His
 1 5 10 15

Cys Gly Cys Pro Ser Asp Asp Asp Val Arg Tyr Pro Leu Ala Ser Asp
 20 25 30

Pro Asn Ala Ala Leu Gln Asn Met Asn Tyr Lys Asp Tyr Leu Gln Met
 35 40 45

Thr Asp Glu Asp Tyr Thr Asp Ser Tyr Ile Asn Pro Ser Leu Ser Ile
 50 55 60

Ser Gly Arg Asp Ala Val Gln Thr Ala Leu Thr Val Val Gly Arg Ile
 65 70 75 80

Ile Gly Ala Leu Gly Val Pro Phe Ser Gly Gln Ile Val Ser Phe Tyr
 85 90 95

Asp Ile Leu Leu Asn Thr Leu Trp Pro Val Asn Asp Thr Ala Ile Trp
 100 105 110

Gln Ala Phe Met Arg Gln Val Glu Glu Leu Val Asn Gln Gln Ile Thr

115	120	125
Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala Leu Ala Arg Leu Gln Gly Leu Gly Asp 130	135	140
Ser Phe Asn Val Tyr Gln Arg Ser Leu Gln Asn Trp Leu Ala Asp Arg 145	150	155 160
Asn Asp Thr Leu Asn Leu Ser Val Val Arg Ala Gln Phe Ile Ala Leu 165	170	175
Asp Leu Asp Phe Val Asn Ala Ile Pro Leu Phe Ala Val Asn Gly Gln 180	185	190
Gln Val Pro Leu Leu Ser Val Tyr Ala Gln Ala Val Asn Leu His Leu 195	200	205
Leu Leu Leu Lys Asp Ala Ser Leu Phe Gly Glu Gly Trp Gly Phe Thr 210	215	220
Gln Gly Glu Ile Ser Thr Tyr Tyr Asp Arg Gln Leu Glu Leu Thr Ala 225	230	235 240
Lys Tyr Thr Asn Tyr Cys Glu Thr Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Asp Arg 245	250	255
Leu Arg Gly Thr Asn Thr Glu Ser Trp Leu Arg Tyr His Gln Phe Arg 260	265	270
Arg Glu Met Thr Leu Val Val Leu Asp Val Val Ala Leu Phe Pro Tyr 275	280	285
Tyr Asp Val Arg Leu Tyr Pro Thr Gly Ser Asn Pro Gln Leu Thr Arg 290	295	300
Glu Val Tyr Thr Asp Pro Ile Val Phe Asn Pro Pro Ala Asn Val Gly 305	310	315 320
Leu Cys Arg Arg Trp Gly Thr Asn Pro Tyr Asn Thr Phe Ser Glu Leu 325	330	335
Glu Asn Ala Phe Ile Arg Pro Pro His Leu Phe Asp Arg Leu Asn Ser 340	345	350
Leu Thr Ile Ser Ser Asn Arg Phe Pro Val Ser Ser Asn Phe Met Asp 355	360	365
Tyr Trp Ser Gly His Thr Leu Arg Arg Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Ala 370	375	380
Val Gln Glu Asp Ser Tyr Gly Leu Ile Thr Thr Thr Arg Ala Thr Ile 385	390	395 400
Asn Pro Gly Val Asp Gly Thr Asn Arg Ile Glu Ser Thr Ala Val Asp 405	410	415
Thr Arg Ser Ala Leu Ile Gly Ile Tyr Gly Val Asn Arg Ala Ser Phe 420	425	430
Val Pro Gly Gly Leu Phe Asn Gly Thr Thr Ser Pro Ala Asn Gly Gly 435	440	445

Cys Arg Asp Leu Tyr Asp Thr Asn Asp Glu Leu Pro Pro Asp Glu Ser
 450 455 460
 Thr Gly Ser Ser Thr His Arg Leu Ser His Val Thr Phe Phe Ser Phe
 465 470 475 480
 Gln Thr Asn Gln Ala Gly Ser Ile Ala Asn Ala Gly Ser Val Pro Thr
 485 490 495
 Tyr Val Trp Thr Arg Arg Asp Val Asp Leu Asn Asn Thr Ile Thr Pro
 500 505 510
 Asn Arg Ile Thr Gln Leu Pro Leu Val Lys Ala Ser Ala Pro Val Ser
 515 520 525
 Gly Thr Thr Val Leu Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Gly Ile Leu
 530 535 540
 Arg Arg Thr Thr Asn Gly Thr Phe Gly Thr Leu Arg Val Thr Val Asn
 545 550 555 560
 Ser Pro Leu Thr Gln Gln Tyr Arg Leu Arg Val Arg Phe Ala Ser Thr
 565 570 575
 Gly Asn Phe Ser Ile Arg Val Leu Arg Gly Gly Val Ser Ile Gly Asp
 580 585 590
 Val Arg Leu Gly Ser Thr Met Asn Arg Gly Gln Glu Leu Thr Tyr Glu
 595 600 605
 Ser Phe Phe Thr Arg Glu Phe Thr Thr Thr Gly Pro Phe Asn Pro Pro
 610 615 620
 Phe Thr Phe Thr Gln Ala Gln Glu Ile Leu Thr Val Asn Ala Glu Gly
 625 630 635 640
 Val Ser Thr Gly Gly Glu Tyr Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Ile Val Pro
 645 650 655
 Val Asn Pro Ala Arg Glu Ala Glu Glu Asp Leu Glu Ala Ala Lys Lys
 660 665 670

Ala

<210> 5

<211> 2019

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<214>

<215> Description de la séquence artificielle: Cry9Ca1 Phe-164

<216>

<217> Phe

<218> (2019)

<219> 5

atg aat cga aat aat caa aat gaa tat gaa att att gat gcc ccc cat	48
Met Asn Arg Asn Asn Gln Asn Glu Tyr Glu Ile Ile Asp Ala Pro His	
1 - 5 10 15	
tgt ggg tgt cca tca gat gac gat gtg agg tat cct ttg gca agt gac	96
Cys Gly Cys Pro Ser Asp Asp Asp Val Arg Tyr Pro Leu Ala Ser Asp	
20 25 30	
cca aat gca gcg tta caa aat atg aac tat aaa gat tac tta caa atg	144
Pro Asn Ala Ala Leu Gln Asn Met Asn Tyr Lys Asp Tyr Leu Gln Met	
35 40 45	
aca gat gag gac tac act gat tct tat ata aat cct agt tta tct att	192
Thr Asp Glu Asp Tyr Thr Asp Ser Tyr Ile Asn Pro Ser Leu Ser Ile	
50 55 60	
agt ggt aga gat gca gtt cag act gcg ctt act gtt gtt ggg aga ata	240
Ser Gly Arg Asp Ala Val Gln Thr Ala Leu Thr Val Val Gly Arg Ile	
65 70 75 80	
ctc ggg gct tta ggt gtt ccg ttt tct gga caa ata gtg agt ttt tat	288
Leu Gly Ala Leu Gly Val Pro Phe Ser Gly Gln Ile Val Ser Phe Tyr	
85 90 95	
caa ttc ctt tta aat aca ctg tgg cca gtt aat gat aca gct ata tgg	336
Gln Phe Leu Leu Asn Thr Leu Trp Pro Val Asn Asp Thr Ala Ile Trp	
100 105 110	
gaa gct ttc atg cga cag gtg gag gaa ctt gtc aat caa caa ata aca	384
Glu Ala Phe Met Arg Gln Val Glu Glu Leu Val Asn Gln Gln Ile Thr	
115 120 125	
gaa ttt gca aga aat cag gca ctt gca aga ttg caa gga tta gga gac	432
Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala Leu Ala Arg Leu Gln Gly Leu Gly Asp	
130 135 140	
tct ttt aat gta tat caa cgt tcc ctt caa aat tgg ttg gct gat cga	480
Ser Phe Asn Val Tyr Gln Arg Ser Leu Gln Asn Trp Leu Ala Asp Arg	
145 150 155 160	
aat gat aca ttt aat tta agt gtt gtt cgt gct caa ttt ata gct tta	528
Asn Asp Thr Phe Asn Leu Ser Val Val Arg Ala Gln Phe Ile Ala Leu	
165 170 175	
gac ctt gat ttt gtt aat gct att cca ttg ttt gca gta aat gga cag	576
Asp Leu Asp Phe Val Asn Ala Ile Pro Leu Phe Ala Val Asn Gly Gln	
180 185 190	
cag gtt cca tta ctg tca gta tat gca caa gct gtg aat tta cat ttg	624
Gln Val Pro Leu Leu Ser Val Tyr Ala Gln Ala Val Asn Leu His Leu	
195 200 205	
tta tta tta aaa gat gca tct ctt ttt gga gaa gga tgg gga ttc aca	672
Leu Leu Leu Lys Asp Ala Ser Leu Phe Gly Glu Gly Trp Gly Phe Thr	
210 215 220	
cag ggg gaa att tcc aca tat tat gac cgt caa ttg gaa cta acc gct	720
Gln Gly Glu Ile Ser Thr Tyr Tyr Asp Arg Gln Leu Glu Leu Thr Ala	
225 230 235 240	
aag tac act aat tac tgt gaa acc tgg tat aat aca ggt tta gat cgt	768

Lys	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Cys	Glu	Thr	Trp	Tyr	Asn	Thr	Gly	Leu	Asp	Arg	
			245					250						255		
tta	aga	gga	aca	aat	act	gaa	agt	tgg	tta	aga	tat	cat	caa	ttc	cgt	816
Leu	Arg	Gly	Thr	Asn	Thr	Glu	Ser	Trp	Leu	Arg	Tyr	His	Gln	Phe	Arg	
			260					265					270			
aga	gaa	atg	act	ttt	gtg	gta	tta	gat	gtt	gtg	gcg	cta	ttt	cca	tat	864
Arg	Glu	Met	Thr	Leu	Val	Val	Leu	Asp	Val	Val	Ala	Leu	Phe	Pro	Tyr	
		275					280					285				
tat	gat	gta	cga	ctt	tat	cca	acg	gga	tca	aac	cca	cag	ctt	aca	cgt	912
Tyr	Asp	Val	Arg	Leu	Tyr	Pro	Thr	Gly	Ser	Asn	Pro	Gln	Leu	Thr	Arg	
	290					295					300					
gag	gta	tat	aca	gat	cgg	att	gta	ttt	aat	cca	cca	gct	aat	gtt	gga	960
Glu	Val	Tyr	Thr	Asp	Pro	Ile	Val	Phe	Asn	Pro	Pro	Ala	Asn	Val	Gly	
305					310					315					320	
ctt	tgc	cga	cgt	tgg	ggt	act	aat	ccc	tat	aat	act	ttt	tct	gag	ctc	1008
Leu	Cys	Arg	Arg	Trp	Gly	Thr	Asn	Pro	Tyr	Asn	Thr	Phe	Ser	Glu	Leu	
				325					330					335		
gaa	aat	gcc	ttc	att	cgc	cca	cca	cat	ctt	ttt	gat	agg	ctg	aat	agc	1056
Glu	Asn	Ala	Phe	Ile	Arg	Pro	Pro	His	Leu	Phe	Asp	Arg	Leu	Asn	Ser	
			340					345					350			
tta	aca	atc	agc	agt	aat	cga	ttt	cca	gtt	tca	tct	aat	ttt	atg	gat	1104
Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Asn	Arg	Phe	Pro	Val	Ser	Ser	Asn	Phe	Met	Asp	
		355					360					365				
tat	tgg	tca	gga	cat	acg	tta	cgc	cgt	agt	tat	ctg	aac	gat	tca	gca	1152
Tyr	Trp	Ser	Gly	His	Thr	Leu	Arg	Arg	Ser	Tyr	Leu	Asn	Asp	Ser	Ala	
	370					375					380					
gta	caa	gaa	gat	agt	tat	ggc	cta	att	aca	acc	aca	aga	gca	aca	att	1200
Val	Gln	Glu	Asp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Ile	Thr	Thr	Thr	Arg	Ala	Thr	Ile	
385					390					395					400	
aat	ccc	gga	gtt	gat	gga	aca	aac	cgc	ata	gag	tca	acg	gca	gta	gat	1248
Asn	Pro	Gly	Val	Asp	Gly	Thr	Asn	Arg	Ile	Glu	Ser	Thr	Ala	Val	Asp	
				405					410					415		
ttt	cgt	tct	gca	ttg	ata	ggt	ata	tat	ggc	gtg	aat	aga	gct	tct	ttt	1296
Phe	Arg	Ser	Ala	Leu	Ile	Gly	Ile	Tyr	Gly	Val	Asn	Arg	Ala	Ser	Phe	
			420					425					430			
gtc	cca	gga	ggc	ttg	ttt	aat	ggt	acg	act	tct	cct	gct	aat	gga	gga	1344
Val	Pro	Gly	Gly	Leu	Phe	Asn	Gly	Thr	Thr	Ser	Pro	Ala	Asn	Gly	Gly	
		435					440					445				
tgt	aga	gat	ctc	tat	gat	aca	aat	gat	gaa	tta	cca	cca	gat	gaa	agt	1392
Cys	Arg	Asp	Leu	Tyr	Asp	Thr	Asn	Asp	Glu	Leu	Pro	Pro	Asp	Glu	Ser	
	450					455					460					
acc	gga	agt	tca	acc	cat	aca	cta	tct	cat	gtt	acc	ttt	ttc	agc	cat	1440
Thr	Gly	Ser	Ser	Thr	His	Arg	Leu	Ser	His	Val	Thr	Phe	Phe	Ser	Phe	
	465				470				475					480		
caa	act	aat	cag	gat	cca	tct	ata	gct	aat	gca	gga	agt	gta	cct	act	1488
Gln	Thr	Asn	Gln	Ala	Gly	Ser	Ile	Ala	Asn	Ala	Gly	Ser	Val	Pro	Thr	

485	490	495	
tat gtt tgg acc cgt cgt gat gtg gac ctt aat aat acg att acc cca Tyr Val Trp Thr Arg Arg Asp Val Asp Leu Asn Asn Thr Ile Thr Pro 500 505 510			1536
aat aga att aca caa tta cca ttg gta aag gca tct gca cct gtt tgg Asn Arg Ile Thr Gln Leu Pro Leu Val Lys Ala Ser Ala Pro Val Ser 515 520 525			1584
ggt act acg gtc tta aaa ggt cca gga ttt aca gga ggg ggt ata ctc Gly Thr Thr Val Leu Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Gly Ile Leu 530 535 540			1632
cga aga aca act aat ggc aca ttt gga acg tta aga gta acg gtt aat Arg Arg Thr Thr Asn Gly Thr Phe Gly Thr Leu Arg Val Thr Val Asn 545 550 555 560			1680
tca cca tta aca caa caa tat cgc cta aga gtt cgt ttt gcc tca aca Ser Pro Leu Thr Gln Gln Tyr Arg Leu Arg Val Arg Phe Ala Ser Thr 565 570 575			1728
gga aat ttc agt ata agg gta ctc cgt gga ggg gtt tct atc ggt gat Gly Asn Phe Ser Ile Arg Val Leu Arg Gly Gly Val Ser Ile Gly Asp 580 585 590			1776
gtt aga tta ggg agc aca atg aac aga ggg cag gaa cta act tac gaa Val Arg Leu Gly Ser Thr Met Asn Arg Gly Gln Glu Leu Thr Tyr Glu 595 600 605			1824
tcc ttt ttc aca aga gag ttt act act act ggt ccg ttc aat ccg cct Ser Phe Phe Thr Arg Glu Phe Thr Thr Thr Gly Pro Phe Asn Pro Pro 610 615 620			1872
ttt aca ttt aca caa gct caa gag att cta aca gtg aat gca gaa ggt Phe Thr Phe Thr Gln Ala Gln Glu Ile Leu Thr Val Asn Ala Glu Gly 625 630 635 640			1920
gtt agc acc ggt ggt gaa tat tat ata gat aga att gaa att gtc cct Val Ser Thr Gly Gly Glu Tyr Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Ile Val Pro 645 650 655			1968
gtg aat ccg gca cga gaa gcg gaa gag gat tta gaa gcg gcg aag aaa Val Asn Pro Ala Arg Glu Ala Glu Glu Asp Leu Glu Ala Ala Lys Lys 660 665 670			2016
gcg Ala			2019

<210> 6

<211> 673

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle: Cry9Ca1 Phe-164

<400> 6

Met Asn Arg Asn Asn Gln Asn Glu Tyr Glu Ile Ile Asp Ala Pro His
1 5 10 15

Cys Gly Cys Pro Ser Asp Asp Asp Val Arg Tyr Pro Leu Ala Ser Asp

1er dépôt

15

20					25					30					
Pro	Asn	Ala	Ala	Leu	Gln	Asn	Met	Asn	Tyr	Lys	Asp	Tyr	Leu	Gln	Met
		35					40					45			
Thr	Asp	Glu	Asp	Tyr	Thr	Asp	Ser	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Leu	Ser	Ile
	50					55					60				
Ser	Gly	Arg	Asp	Ala	Val	Gln	Thr	Ala	Leu	Thr	Val	Val	Gly	Arg	Ile
65						70					75				80
Leu	Gly	Ala	Leu	Gly	Val	Pro	Phe	Ser	Gly	Gln	Ile	Val	Ser	Phe	Tyr
				85					90					95	
Gln	Phe	Leu	Leu	Asn	Thr	Leu	Trp	Pro	Val	Asn	Asp	Thr	Ala	Ile	Trp
			100					105					110		
Glu	Ala	Phe	Met	Arg	Gln	Val	Glu	Glu	Leu	Val	Asn	Gln	Gln	Ile	Thr
		115					120					125			
Glu	Phe	Ala	Arg	Asn	Gln	Ala	Leu	Ala	Arg	Leu	Gln	Gly	Leu	Gly	Asp
	130					135					140				
Ser	Phe	Asn	Val	Tyr	Gln	Arg	Ser	Leu	Gln	Asn	Trp	Leu	Ala	Asp	Arg
145						150					155				160
Asn	Asp	Thr	Phe	Asn	Leu	Ser	Val	Val	Arg	Ala	Gln	Phe	Ile	Ala	Leu
				165					170					175	
Asp	Leu	Asp	Phe	Val	Asn	Ala	Ile	Pro	Leu	Phe	Ala	Val	Asn	Gly	Gln
			180					185					190		
Gln	Val	Pro	Leu	Leu	Ser	Val	Tyr	Ala	Gln	Ala	Val	Asn	Leu	His	Leu
		195					200					205			
Leu	Leu	Leu	Lys	Asp	Ala	Ser	Leu	Phe	Gly	Glu	Gly	Trp	Gly	Phe	Thr
	210					215					220				
Gln	Gly	Glu	Ile	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asp	Arg	Gln	Leu	Glu	Leu	Thr	Ala
225						230					235				240
Lys	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Cys	Glu	Thr	Trp	Tyr	Asn	Thr	Gly	Leu	Asp	Arg
			245						250					255	
Leu	Arg	Gly	Thr	Asn	Thr	Glu	Ser	Trp	Leu	Arg	Tyr	His	Gln	Phe	Arg
			260					265					270		
Arg	Glu	Met	Thr	Leu	Val	Val	Leu	Asp	Val	Val	Ala	Leu	Phe	Pro	Tyr
		275					280					285			
Tyr	Asp	Val	Arg	Leu	Tyr	Pro	Thr	Gly	Ser	Asn	Pro	Gln	Leu	Thr	Arg
	290					295					300				
Glu	Val	Tyr	Thr	Asp	Pro	Ile	Val	Phe	Asn	Pro	Pro	Ala	Asn	Val	Gly
305						310					315				320
Leu	Cys	Arg	Arg	Trp	Gly	Thr	Asn	Pro	Tyr	Asn	Thr	Phe	Ser	Glu	Leu
			325						330					335	
Glu	Asn	Ala	Phe	Ile	Arg	Pro	Pro	His	Leu	Phe	Asp	Arg	Leu	Asn	Ser
		340						345					350		

Leu Thr Ile Ser Ser Asn Arg Phe Pro Val Ser Ser Asn Phe Met Asp
 355 360 365
 Tyr Trp Ser Gly His Thr Leu Arg Arg Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Ala
 370 375 380
 Val Gln Glu Asp Ser Tyr Gly Leu Ile Thr Thr Thr Arg Ala Thr Ile
 385 390 395 400
 Asn Pro Gly Val Asp Gly Thr Asn Arg Ile Glu Ser Thr Ala Val Asp
 405 410 415
 Phe Arg Ser Ala Leu Ile Gly Ile Tyr Gly Val Asn Arg Ala Ser Phe
 420 425 430
 Val Pro Gly Gly Leu Phe Asn Gly Thr Thr Ser Pro Ala Asn Gly Gly
 435 440 445
 Cys Arg Asp Leu Tyr Asp Thr Asn Asp Glu Leu Pro Pro Asp Glu Ser
 450 455 460
 Thr Gly Ser Ser Thr His Arg Leu Ser His Val Thr Phe Phe Ser Phe
 465 470 475 480
 Gln Thr Asn Gln Ala Gly Ser Ile Ala Asn Ala Gly Ser Val Pro Thr
 485 490 495
 Tyr Val Trp Thr Arg Arg Asp Val Asp Leu Asn Asn Thr Ile Thr Pro
 500 505 510
 Asn Arg Ile Thr Gln Leu Pro Leu Val Lys Ala Ser Ala Pro Val Ser
 515 520 525
 Gly Thr Thr Val Leu Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Gly Ile Leu
 530 535 540
 Arg Arg Thr Thr Asn Gly Thr Phe Gly Thr Leu Arg Val Thr Val Asn
 545 550 555 560
 Ser Pro Leu Thr Gln Gln Tyr Arg Leu Arg Val Arg Phe Ala Ser Thr
 565 570 575
 Gly Asn Phe Ser Ile Arg Val Leu Arg Gly Gly Val Ser Ile Gly Asp
 580 585 590
 Val Arg Leu Gly Ser Thr Met Asn Arg Gly Gln Glu Leu Thr Tyr Glu
 595 600 605
 Ser Phe Phe Thr Arg Glu Phe Thr Thr Thr Gly Pro Phe Asn Pro Pro
 610 615 620
 Phe Thr Phe Thr Gln Ala Gln Glu Ile Leu Thr Val Asn Ala Glu Gly
 625 630 635 640
 Val Ser Thr Gly Gly Glu Tyr Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Ile Val Pro
 645 650 655
 Val Asn Pro Ala Arg Glu Ala Glu Glu Asp Leu Glu Ala Ala Lys Lys
 660 665 670

Ala

<210> 7

<211> 2019

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Cry9Ca1 Glu-164

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2019)

<400> 7

atg aat cga aat aat caa aat gaa tat gaa att att gat gcc ccc cat	48
Met Asn Arg Asn Asn Gln Asn Glu Tyr Glu Ile Ile Asp Ala Pro His	
1 5 10 15	
tgt ggg tgt cca tca gat gac gat gtg agg tat cct ttg gca agt gac	96
Cys Gly Cys Pro Ser Asp Asp Asp Val Arg Tyr Pro Leu Ala Ser Asp	
20 25 30	
cca aat gca gcg tta caa aat atg aac tat aaa gat tac tta caa atg	144
Pro Asn Ala Ala Leu Gln Asn Met Asn Tyr Lys Asp Tyr Leu Gln Met	
35 40 45	
aca gat gag gac tac act gat tct tat ata aat cct agt tta tct att	192
Thr Asp Glu Asp Tyr Thr Asp Ser Tyr Ile Asn Pro Ser Leu Ser Ile	
50 55 60	
agt ggt aga gat gca gtt cag act gcg ctt act gtt gtt ggg aga ata	240
Ser Gly Arg Asp Ala Val Gln Thr Ala Leu Thr Val Val Gly Arg Ile	
65 70 75 80	
ctc ggg gct tta ggt gtt ccg ttt tct gga caa ata gtg agt ttt tat	288
Leu Gly Ala Leu Gly Val Pro Phe Ser Gly Gln Ile Val Ser Phe Tyr	
85 90 95	
caa ttc ctt tta aat aca ctg tgg cca gtt aat gat aca gct ata tgg	336
Gln Phe Leu Leu Asn Thr Leu Trp Pro Val Asn Asp Thr Ala Ile Trp	
100 105 110	
gaa gct ttc atg cga cag gtg gag gaa ctt gtc aat caa caa ata aca	384
Glu Ala Phe Met Arg Gln Val Glu Glu Leu Val Asn Gln Gln Ile Thr	
115 120 125	
gaa ttt gca aga aat cag gca ctt gca aga ttg caa gga tta gga gac	432
Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala Leu Ala Arg Leu Gln Gly Leu Gly Asp	
130 135 140	
tat ttt aat gta tat caa cct ttc ctt caa aat tgg ttg gct gat cga	480
Ser Phe Asn Val Tyr Gln Arg Ser Leu Gln Asn Trp Leu Ala Asp Arg	
145 150 155 160	
gag gat aca gaa aat tta agt ggt gtt cgt gct caa ttt ata gct tta	528
Asn Asp Thr Glu Asn Leu Ser Val Val Arg Ala Gln Phe Ile Ala Leu	
165 170 175	

gac ctt gat ttt gtt aat gct att cca ttg ttt gca gta aat gga cag Asp Leu Asp Phe Val Asn Ala Ile Pro Leu Phe Ala Val Asn Gly Gln 180 185 190	576
cag gtt cca tta ctg tca gta tat gca caa gct gtg aat tta cat ttg Gln Val Pro Leu Leu Ser Val Tyr Ala Gln Ala Val Asn Leu His Leu 195 200 205	624
tta tta tta aaa gat gca tct ctt ttt gga gaa gga tgg gga ttc aca Leu Leu Leu Lys Asp Ala Ser Leu Phe Gly Glu Gly Trp Gly Phe Thr 210 215 220	672
cag ggg gaa att tcc aca tat tat gac cgt caa ttg gaa cta acc gct Gln Gly Glu Ile Ser Thr Tyr Tyr Asp Arg Gln Leu Glu Leu Thr Ala 225 230 235 240	720
aag tac act aat tac tgt gaa act tgg tat aat aca ggt tta gat cgt Lys Tyr Thr Asn Tyr Cys Glu Thr Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Asp Arg 245 250 255	768
tta aga gga aca aat act gaa agt tgg tta aga tat cat caa ttc cgt Leu Arg Gly Thr Asn Thr Glu Ser Trp Leu Arg Tyr His Gln Phe Arg 260 265 270	816
aga gaa atg act tta gtg gta tta gat gtt gtg gcg cta ttt cca tat Arg Glu Met Thr Leu Val Val Leu Asp Val Val Ala Leu Phe Pro Tyr 275 280 285	864
tat gat gta cga ctt tat cca acg gga tca aac cca cag ctt aca cgt Tyr Asp Val Arg Leu Tyr Pro Thr Gly Ser Asn Pro Gln Leu Thr Arg 290 295 300	912
gag gta tat aca gat ccg att gta ttt aat cca cca gct aat gtt gga Glu Val Tyr Thr Asp Pro Ile Val Phe Asn Pro Pro Ala Asn Val Gly 305 310 315 320	960
ctt tgc cga cgt tgg ggt act aat ccc tat aat act ttt tct gag ctc Leu Cys Arg Arg Trp Gly Thr Asn Pro Tyr Asn Thr Phe Ser Glu Leu 325 330 335	1008
gaa aat gcc ttc att cgc cca cca cat ctt ttt gat agg ctg aat agc Glu Asn Ala Phe Ile Arg Pro Pro His Leu Phe Asp Arg Leu Asn Ser 340 345 350	1056
tta aca atc agc agt aat cga ttt cca gtt tca tct aat ttt atg gat Leu Thr Ile Ser Ser Asn Arg Phe Pro Val Ser Ser Asn Phe Met Asp 355 360 365	1104
tat tgg tca gga cat acg tta cgc cgt agt tat ctg aac gat tca gca Tyr Trp Ser Gly His Thr Leu Arg Arg Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Ala 370 375 380	1152
cta cca cca gat agt tat ggc cta att aca acc aca aga gca aca att Val Gln Glu Asp Ser Tyr Gly Leu Ile Thr Thr Thr Arg Ala Thr Ile 385 390 395 400	1200
att ccc gga gtt gat gga aca aac cgc ata gag tca acc gca gta gat Asn Pro Gly Val Asp Gly Thr Asn Arg Ile Glu Ser Thr Ala Val Asp 405 410 415	1248

ttt	agt	tct	gca	trg	ata	ggt	aca	tat	ggc	gtg	aat	aga	gct	tct	ttt	1276
Phe	Arg	Ser	Ala	Leu	Ile	Gly	Ile	Tyr	Gly	Val	Asn	Arg	Ala	Ser	Phe	
			420	-				425					430			
gtc	cca	gga	ggc	ttg	ttt	aat	ggt	acg	act	tct	cct	gct	aat	gga	gga	1344
Val	Pro	Gly	Gly	Leu	Phe	Asn	Gly	Thr	Thr	Ser	Pro	Ala	Asn	Gly	Gly	
		435					440					445				
tgt	aga	gat	ctc	tat	gat	aca	aat	gat	gaa	tta	cca	cca	gat	gaa	agt	1392
Cys	Arg	Asp	Leu	Tyr	Asp	Thr	Asn	Asp	Glu	Leu	Pro	Pro	Asp	Glu	Ser	
	450					455					460					
acc	gga	agt	tta	acc	cat	aga	cta	tct	cat	gtt	acc	ttt	ttt	agc	ttt	1440
Thr	Gly	Ser	Ser	Thr	His	Arg	Leu	Ser	His	Val	Thr	Phe	Phe	Ser	Phe	
465					470				475						480	
caa	act	aat	cag	gct	gga	tct	ata	gct	aat	gca	gga	agt	gta	cct	act	1488
Gln	Thr	Asn	Gln	Ala	Gly	Ser	Ile	Ala	Asn	Ala	Gly	Ser	Val	Pro	Thr	
			485					490						495		
tat	gtt	tgg	acc	cgt	cgt	gat	gtg	gac	ctt	aat	aat	acg	att	acc	cca	1536
Tyr	Val	Trp	Thr	Arg	Arg	Asp	Val	Asp	Leu	Asn	Asn	Thr	Ile	Thr	Pro	
			500					505					510			
aat	aga	att	aca	caa	tta	cca	ttg	gta	aag	gca	tct	gca	cct	gtt	tgc	1584
Asn	Arg	Ile	Thr	Gln	Leu	Pro	Leu	Val	Lys	Ala	Ser	Ala	Pro	Val	Ser	
		515					520					525				
ggt	act	acg	gtc	tta	aaa	ggt	cca	gga	ttt	aca	gga	ggg	ggt	ata	ctc	1632
Gly	Thr	Thr	Val	Leu	Lys	Gly	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	Gly	Gly	Ile	Leu	
530						535					540					
cga	aga	aca	act	aat	ggc	aca	ttt	gga	acg	tta	aga	gta	acg	gtt	aat	1680
Arg	Arg	Thr	Thr	Asn	Gly	Thr	Phe	Gly	Thr	Leu	Arg	Val	Thr	Val	Asn	
545					550					555					560	
tca	cca	tta	aca	caa	caa	tat	cgc	cta	aga	gtt	cgt	ttt	gcc	tca	aca	1728
Ser	Pro	Leu	Thr	Gln	Gln	Tyr	Arg	Leu	Arg	Val	Arg	Phe	Ala	Ser	Thr	
			565					570					575			
gga	aal	ttc	agt	ata	agg	gta	ctc	cgt	gga	ggg	gtt	tct	atc	ggt	gat	1776
Gly	Asn	Phe	Ser	Ile	Arg	Val	Leu	Arg	Gly	Gly	Val	Ser	Ile	Gly	Asp	
		580						585					590			
gtt	aga	tta	ggg	agg	aca	atg	aac	aga	ggg	cag	gaa	cta	act	tac	gaa	1824
Val	Arg	Leu	Gly	Ser	Thr	Met	Asn	Arg	Gly	Gln	Glu	Leu	Thr	Tyr	Glu	
		595					600					605				
cct	ttt	ttc	aca	aga	gag	ttc	act	act	act	ggt	ccg	ttc	aat	ccg	cct	1872
Ser	Phe	Phe	Thr	Arg	Glu	Phe	Thr	Thr	Thr	Gly	Pro	Phe	Asn	Pro	Pro	
	610					615					620					
ttt	aca	tat	tca	caa	gct	caa	cag	att	cta	aca	gtg	aat	gca	gaa	ggc	1920
Ile	Thr	Ile	Thr	Ala	Ala	Gln	Glu	Ile	Leu	Thr	Val	Asn	Ala	Glu	Gly	
625				630						635					640	
ttt	taa	acc	act	ggt	gaa	tat	tat	ata	gat	aga	att	gaa	ttt	ctc	cct	1968
Val	Arg	Thr	Gly	Gly	Gln	Tyr	Tyr	Ile	Asp	Arg	Ile	Gln	Ile	Val	Pro	
			645					650					655			
ttt	aat	cag	gaa	cgt	taa	cct	gaa	gag	gat	tta	gaa	gct	ccg	cag	aaa	2016

Val Asn Pro Ala Arg Glu Ala Glu Glu Asp Leu Glu Ala Ala Lys Lys
 660 665 670

gcg
 Ala

2019

<210> 8
 <211> 673
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle
 <223> Description de la séquence artificielle: Cry9Cal Glu-164

<400> 8
 Met Asn Arg Asn Asn Gln Asn Glu Tyr Glu Ile Ile Asp Ala Pro His
 1 5 10 15

Cys Gly Cys Pro Ser Asp Asp Asp Val Arg Tyr Pro Leu Ala Ser Asp
 20 25 30

Pro Asn Ala Ala Leu Gln Asn Met Asn Tyr Lys Asp Tyr Leu Gln Met
 35 40 45

Thr Asp Glu Asp Tyr Thr Asp Ser Tyr Ile Asn Pro Ser Leu Ser Ile
 50 55 60

Ser Gly Arg Asp Ala Val Gln Thr Ala Leu Thr Val Val Gly Arg Ile
 65 70 75 80

Leu Gly Ala Leu Gly Val Pro Phe Ser Gly Gln Ile Val Ser Phe Tyr
 85 90 95

Gln Phe Leu Leu Asn Thr Leu Trp Pro Val Asn Asp Thr Ala Ile Trp
 100 105 110

Glu Ala Phe Met Arg Gln Val Glu Glu Leu Val Asn Gln Gln Ile Thr
 115 120 125

Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala Leu Ala Arg Leu Gln Gly Leu Gly Asp
 130 135 140

Ser Phe Asn Val Tyr Gln Arg Ser Leu Gln Asn Trp Leu Ala Asp Arg
 145 150 155 160

Asn Asp Thr Glu Asn Leu Ser Val Val Arg Ala Gln Phe Ile Ala Leu
 165 170 175

Asp Leu Asp Phe Val Asn Ala Ile Pro Leu Phe Ala Val Asn Gly Gln
 180 185 190

Gln Val Pro Leu Leu Ser Val Tyr Ala Gln Ala Val Asn Leu His Leu
 195 200 205

Leu Leu Leu Lys Asp Ala Ser Leu Phe Gly Glu Gly Trp Gly Phe Thr
 210 215 220

Gln Gly Glu Ile Ser Thr Tyr Tyr Asp Arg Gln Leu Glu Leu Thr Ala
 225 230 235 240

Lys Tyr Thr Asn Tyr Cys Glu Thr Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Asp Arg
 245 250 255

Leu Arg Gly Thr Asn Thr Glu Ser Trp Leu Arg Tyr His Gln Phe Arg
 260 265 270
 Arg Glu Met Thr Leu Val Val Leu Asp Val Val Ala Leu Phe Pro Tyr
 275 280 285
 Tyr Asp Val Arg Leu Tyr Pro Thr Gly Ser Asn Pro Gln Leu Thr Arg
 290 295 300
 Glu Val Tyr Thr Asp Pro Ile Val Phe Asn Pro Pro Ala Asn Val Gly
 305 310 315 320
 Leu Cys Arg Arg Trp Gly Thr Asn Pro Tyr Asn Thr Phe Ser Glu Leu
 325 330 335
 Glu Asn Ala Phe Ile Arg Pro Pro His Leu Phe Asp Arg Leu Asn Ser
 340 345 350
 Leu Thr Ile Ser Ser Asn Arg Phe Pro Val Ser Ser Asn Phe Met Asp
 355 360 365
 Tyr Trp Ser Gly His Thr Leu Arg Arg Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Ala
 370 375 380
 Val Gln Glu Asp Ser Tyr Gly Leu Ile Thr Thr Thr Arg Ala Thr Ile
 385 390 395 400
 Asn Pro Gly Val Asp Gly Thr Asn Arg Ile Glu Ser Thr Ala Val Asp
 405 410 415
 Phe Arg Ser Ala Leu Ile Gly Ile Tyr Gly Val Asn Arg Ala Ser Phe
 420 425 430
 Val Pro Gly Gly Leu Phe Asn Gly Thr Thr Ser Pro Ala Asn Gly Gly
 435 440 445
 Cys Arg Asp Leu Tyr Asp Thr Asn Asp Glu Leu Pro Pro Asp Glu Ser
 450 455 460
 Thr Gly Ser Ser Thr His Arg Leu Ser His Val Thr Phe Phe Ser Phe
 465 470 475 480
 Gln Thr Asn Gln Ala Gly Ser Ile Ala Asn Ala Gly Ser Val Pro Thr
 485 490 495
 Tyr Val Trp Thr Arg Arg Asp Val Asp Leu Asn Asn Thr Ile Thr Pro
 500 505 510
 Asn Arg Ile Thr Gln Leu Pro Leu Val Lys Ala Ser Ala Pro Val Ser
 515 520 525
 Gly Thr Thr Val Leu Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Gly Ile Leu
 530 535 540
 Arg Arg Thr Thr Asn Gly Thr Phe Gly Thr Leu Arg Val Thr Val Asn
 545 550 555 560
 Ser Pro Leu Thr Gln Gln Tyr Arg Leu Arg Val Arg Phe Ala Ser Thr
 565 570 575

Gly Asn Phe Ser Ile Arg Val Leu Arg Gly Gly Val Ser Ile Gly Asp
 580 585 590

Val Arg Leu Gly Ser Thr Met Asn Arg Gly Gln Glu Leu Thr Tyr Glu
 595 600 605

Ser Phe Phe Thr Arg Glu Phe Thr Thr Thr Gly Pro Phe Asn Pro Pro
 610 615 620

Phe Thr Phe Thr Gln Ala Gln Glu Ile Leu Thr Val Asn Ala Glu Gly
 625 630 635 640

Val Ser Thr Gly Gly Glu Tyr Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Ile Val Pro
 645 650 655

Val Asn Pro Ala Arg Glu Ala Glu Glu Asp Leu Glu Ala Ala Lys Lys
 660 665 670

Ala

<210> 9

<211> 2019

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Cry9Cal-100%

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2019)

<400> 9

atg aat cga aat aat caa aat gaa tat gaa att att gaa gcc ccc cat 48
 Met Asn Arg Asn Asn Gln Asn Glu Tyr Glu Ile Ile Glu Ala Pro His
 1 5 10 15

tgt ggg tgt cca tca gaa gaa gaa tta agg tat cct ttg gca agt gaa 96
 Cys Gly Cys Pro Ser Glu Glu Glu Leu Arg Tyr Pro Leu Ala Ser Glu
 20 25 30

cca aat gca gcg tta caa aat atg aac tat aaa gaa tac tta caa atg 144
 Pro Asn Ala Ala Leu Gln Asn Met Asn Tyr Lys Glu Tyr Leu Gln Met
 35 40 45

aca gaa gag gaa tac act gaa tct tat ata aat cct agt tta tct att 192
 Thr Glu Glu Glu Tyr Thr Glu Ser Tyr Ile Asn Pro Ser Leu Ser Ile
 50 55 60

agt ggt aga gaa gca tta caa aat gcg ctt act gtt att agg aga ata 240
 Ser Gly Arg Glu Ala Leu Gln Thr Ala Leu Thr Val Ile Arg Arg Ile
 65 70 75 80

ctc ggc ggt tta ggt tta caa ttt tct gga caa ata tta act ttt tat 288
 Leu Gly Ala Leu Gly Leu Pro Phe Ser Gly Gln Ile Leu Ser Phe Tyr
 85 90 95

caa ttc ctt tta aat aca cgc ttt cca tta aat gaa aca gct ata ttt 336

Gln	Phe	Leu	Leu	Asn	Thr	Leu	Phe	Pro	Leu	Asn	Glu	Thr	Ala	Ile	Phe	
			100					105						110		
gaa	gct	ttc	atg	cga	cag	tta	gag	gaa	ctt	tta	aat	caa	caa	ata	aca	384
Glu	Ala	Phe	Met	Arg	Gln	Leu	Glu	Glu	Leu	Leu	Asn	Gln	Gln	Ile	Thr	
		115					120					125				
gaa	ttt	gca	aga	aat	cag	gca	ctt	gca	aga	ttg	caa	gga	tta	gga	gaa	432
Glu	Phe	Ala	Arg	Asn	Gln	Ala	Leu	Ala	Arg	Leu	Gln	Gly	Leu	Gly	Glu	
	130					135					140					
tct	ttt	aat	tta	tat	caa	cgt	tcc	ctt	caa	aat	ttt	ttg	gct	gaa	cga	480
Ser	Phe	Asn	Leu	Tyr	Gln	Arg	Ser	Leu	Gln	Asn	Phe	Leu	Ala	Glu	Arg	
145					150					155					160	
aat	gaa	aca	cga	aat	tta	agt	tta	tta	cgt	gct	caa	ttt	ata	gct	tta	528
Asn	Glu	Thr	Arg	Asn	Leu	Ser	Leu	Leu	Arg	Ala	Gln	Phe	Ile	Ala	Leu	
			165						170					175		
gaa	ctt	gaa	ttt	tta	aat	gct	att	cca	ttg	ttt	gca	tta	aat	gga	cag	576
Glu	Leu	Glu	Phe	Leu	Asn	Ala	Ile	Pro	Leu	Phe	Ala	Leu	Asn	Gly	Gln	
			180					185					190			
cag	tta	cca	tta	ctg	tca	tta	tat	gca	caa	gct	tta	aat	tta	cat	ttg	624
Gln	Leu	Pro	Leu	Leu	Ser	Leu	Tyr	Ala	Gln	Ala	Leu	Asn	Leu	His	Leu	
		195					200					205				
tta	tta	tta	aaa	gaa	gca	tct	ctt	ttt	gga	gaa	gga	ttt	gga	ttc	aca	672
Leu	Leu	Leu	Lys	Glu	Ala	Ser	Leu	Phe	Gly	Glu	Gly	Phe	Gly	Phe	Thr	
	210					215					220					
cag	ggg	gaa	att	tcc	aca	tat	tat	gaa	cgt	caa	ttg	gaa	cta	acc	gct	720
Gln	Gly	Glu	Ile	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Glu	Arg	Gln	Leu	Glu	Leu	Thr	Ala	
225					230					235					240	
aag	tac	act	aat	tac	tgt	gaa	act	ttt	tat	aat	aca	ggg	tta	gaa	cgt	768
Lys	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Cys	Glu	Thr	Phe	Tyr	Asn	Thr	Gly	Leu	Glu	Arg	
			245						250					255		
tta	aga	gga	aca	aat	act	gaa	agt	ttt	tta	aga	tat	cat	caa	ttc	cgt	816
Leu	Arg	Gly	Thr	Asn	Thr	Glu	Ser	Phe	Leu	Arg	Tyr	His	Gln	Phe	Arg	
			260					265					270			
aga	gaa	atg	act	tta	tta	tta	tta	gaa	tta	tta	gcg	cta	ttt	cca	tat	864
Arg	Glu	Met	Thr	Leu	Leu	Leu	Leu	Glu	Leu	Leu	Ala	Leu	Phe	Pro	Tyr	
		275					280					285				
tat	gaa	tta	cga	ctt	tat	cca	acg	gga	tca	aac	cca	cag	ctt	aca	cgt	912
Tyr	Glu	Leu	Arg	Leu	Tyr	Pro	Thr	Gly	Ser	Asn	Pro	Gln	Leu	Thr	Arg	
	290					295					300					
gag	tta	tat	aca	gaa	cag	att	tta	ttt	aat	cca	cca	gct	aat	tta	gga	960
Glu	Leu	Tyr	Thr	Glu	Pro	Ile	Leu	Phe	Asn	Pro	Pro	Ala	Asn	Leu	Gly	
305					310					315					320	
att	ggg	cga	cgt	ttt	ggt	act	aat	ccc	tat	aat	act	ttt	tct	gag	ctc	1008
Leu	Cys	Arg	Arg	Phe	Gly	Thr	Asn	Pro	Tyr	Asn	Thr	Phe	Ser	Glu	Leu	
			325					330						335		
gaa	aat	gac	ttc	att	cgt	cca	cca	cat	ctt	ttt	gaa	agg	ctg	aat	agc	1056
Glu	Asn	Ala	Phe	Ile	Arg	Phe	Pro	His	Leu	Phe	Glu	Arg	Leu	Asn	Ser	

340	345	350	
tta aca atc agc agt aat cga ttt cca tta tca tct aat ttt atg gaa			1104
Leu Thr Ile Ser Ser Asn Arg Phe Pro Leu Ser Ser Asn Phe Met Glu			
355	360	365	
tat ttt tca gga cat acg tta cgc cgt agt tat ctg aac gaa tca gca			1152
Tyr Phe Ser Gly His Thr Leu Arg Arg Ser Tyr Leu Asn Glu Ser Ala			
370	375	380	
tta caa gaa gaa agt tat ggc cta att aca acc aca aga gca aca att			1200
Leu Gln Glu Glu Ser Tyr Gly Leu Ile Thr Thr Thr Arg Ala Thr Ile			
385	390	395	400
aat ccc gga tta gaa gga aca aac cgc ata gag tca acg gca tta gaa			1248
Asn Pro Gly Leu Glu Gly Thr Asn Arg Ile Glu Ser Thr Ala Leu Glu			
405	410	415	
ttt cgt tct gca ttg ata ggt ata tat ggc tta aat aga gct tct ttt			1296
Phe Arg Ser Ala Leu Ile Gly Ile Tyr Gly Leu Asn Arg Ala Ser Phe			
420	425	430	
tta cca gga ggc ttg ttt aat ggt acg act tct cct gct aat gga gga			1344
Leu Pro Gly Gly Leu Phe Asn Gly Thr Thr Ser Pro Ala Asn Gly Gly			
435	440	445	
tgt aga gaa ctc tat gaa aca aat gaa gaa tta cca cca gaa gaa agt			1392
Cys Arg Glu Leu Tyr Glu Thr Asn Glu Glu Leu Pro Pro Glu Glu Ser			
450	455	460	
acc gga agt tca acc cat aga cta tct cat tta acc ttt ttt agc ttt			1440
Thr Gly Ser Ser Thr His Arg Leu Ser His Leu Thr Phe Phe Ser Phe			
465	470	475	480
caa act aat cag gct gga tct ata gct aat gca gga agt tta cct act			1488
Gln Thr Asn Gln Ala Gly Ser Ile Ala Asn Ala Gly Ser Leu Pro Thr			
485	490	495	
tat tta ttt acc cgt cgt gaa tta gaa ctt aat aat acg att acc cca			1536
Tyr Leu Phe Thr Arg Arg Glu Leu Glu Leu Asn Asn Thr Ile Thr Pro			
500	505	510	
aal aga att aca caa tta cca ttg tta aag gca tct gca cct tta tct			1584
Asn Arg Ile Thr Gln Leu Pro Leu Leu Lys Ala Ser Ala Pro Leu Ser			
515	520	525	
ggc act acg tta tta aaa ggt cca gga ttt aca gga ggg ggt ata ctc			1632
Gly Thr Thr Leu Leu Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Gly Ile Leu			
530	535	540	
cga aga aca act aat ggc aca ttt gga acg tta aga tta acg tta aat			1680
Arg Arg Thr Thr Asn Gly Thr Phe Gly Thr Leu Arg Leu Thr Leu Asn			
545	550	555	560
tca cca tta aca caa caa tat cga cta aga tta cgt tct ggc tca aca			1728
Ser Pro Leu Thr Gln Gln Tyr Arg Leu Arg Leu Arg Phe Ala Ser Thr			
565	570	575	
tta aat ttc agt cta agg tta cta cgt gga ggg tta tct atc ggt gaa			1776
Gly Asn Phe Ser Ile Arg Leu Leu Arg Gly Gly Leu Ser Ile Gly Glu			
580	585	590	

```

tta aga tta ggg agc aca atg aac aga ggg cag gaa cta act tac gaa 1824
Leu Arg Leu Gly Ser Thr Met Asn Arg Gly Gln Glu Leu Thr Tyr Glu
595 600 605

tcc tit ttc aca aga gag ttt act act act ggt ccg ttc aat ccg cct 1872
Ser Phe Phe Thr Arg Glu Phe Thr Thr Thr Gly Pro Phe Asn Pro Pro
610 615 620

ttt aca ttt aca aca gct caa gag att cta aca tta aat gca gaa ggt 1920
Phe Thr Phe Thr Gln Ala Gln Glu Ile Leu Thr Leu Asn Ala Glu Gly
625 630 635 640

tta agc acc ggt ggt gaa tat tat ata gaa aga att gaa att tta cct 1968
Leu Ser Thr Gly Glu Tyr Tyr Ile Glu Arg Ile Glu Ile Leu Pro
645 650 655

tta aat ccg gca cga gaa gcg gaa gag gaa tta gaa gcg gcg aag aaa 2016
Leu Asn Pro Ala Arg Glu Ala Glu Glu Glu Leu Glu Ala Ala Lys Lys
660 665 670

gcg
Ala 2019

```

<210> 10

<211> 673

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle: Cry9Ca1-100%

<400> 10

```

Met Asn Arg Asn Asn Gln Asn Glu Tyr Glu Ile Ile Glu Ala Pro His
  1          5          10          15

Cys Gly Cys Pro Ser Glu Glu Glu Leu Arg Tyr Pro Leu Ala Ser Glu
  20          25          30

Pro Asn Ala Ala Leu Gln Asn Met Asn Tyr Lys Glu Tyr Leu Gln Met
  35          40          45

Thr Glu Glu Glu Tyr Thr Glu Ser Tyr Ile Asn Pro Ser Leu Ser Ile
  50          55          60

Ser Gly Arg Glu Ala Leu Gln Thr Ala Leu Thr Val Ile Arg Arg Ile
  65          70          75          80

Leu Gly Ala Leu Gly Leu Pro Phe Ser Gly Gln Ile Leu Ser Phe Tyr
  85          90          95

Gln Phe Leu Leu Asn Thr Leu Phe Pro Leu Asn Glu Thr Ala Ile Phe
 100          105          110

Glu Ala Phe Met Arg Gln Leu Glu Glu Leu Leu Asn Gln Gln Ile Thr
 115          120          125

Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala Leu Ala Arg Leu Gln Gly Leu Gly Glu
 130          135          140

Ser Phe Asn Leu Tyr Gln Arg Ser Leu Gln Asn Phe Leu Ala Glu Arg
 145          150          155          160

```


Asn Glu Thr Arg Asn Leu Ser Leu Leu Arg Ala Gln Phe Ile Ala Leu
 165 170 175
 Glu Leu Glu Phe Leu Asn Ala Ile Pro Leu Phe Ala Leu Asn Gly Gln
 180 185 190
 Gln Leu Pro Leu Leu Ser Leu Tyr Ala Gln Ala Leu Asn Leu His Leu
 195 200 205
 Leu Leu Leu Lys Glu Ala Ser Leu Phe Gly Glu Gly Phe Gly Phe Thr
 210 215 220
 Gln Gly Glu Ile Ser Thr Tyr Tyr Glu Arg Gln Leu Glu Leu Thr Ala
 225 230 235 240
 Lys Tyr Thr Asn Tyr Cys Glu Thr Phe Tyr Asn Thr Gly Leu Glu Arg
 245 250 255
 Leu Arg Gly Thr Asn Thr Glu Ser Phe Leu Arg Tyr His Gln Phe Arg
 260 265 270
 Arg Glu Met Thr Leu Leu Leu Leu Glu Leu Leu Ala Leu Phe Pro Tyr
 275 280 285
 Tyr Glu Leu Arg Leu Tyr Pro Thr Gly Ser Asn Pro Gln Leu Thr Arg
 290 295 300
 Glu Leu Tyr Thr Glu Pro Ile Leu Phe Asn Pro Pro Ala Asn Leu Gly
 305 310 315 320
 Leu Cys Arg Arg Phe Gly Thr Asn Pro Tyr Asn Thr Phe Ser Glu Leu
 325 330 335
 Glu Asn Ala Phe Ile Arg Pro Pro His Leu Phe Glu Arg Leu Asn Ser
 340 345 350
 Leu Thr Ile Ser Ser Asn Arg Phe Pro Leu Ser Ser Asn Phe Met Glu
 355 360 365
 Tyr Phe Ser Gly His Thr Leu Arg Arg Ser Tyr Leu Asn Glu Ser Ala
 370 375 380
 Leu Gln Glu Glu Ser Tyr Gly Leu Ile Thr Thr Thr Arg Ala Thr Ile
 385 390 395 400
 Asn Pro Gly Leu Glu Gly Thr Asn Arg Ile Glu Ser Thr Ala Leu Glu
 405 410 415
 Phe Arg Ser Ala Leu Ile Gly Ile Tyr Gly Leu Asn Arg Ala Ser Phe
 420 425 430
 Leu Thr Gly Gly Leu Phe Asn Gly Thr Thr Ser Pro Ala Asn Gly Gly
 435 440 445
 Tyr Arg Glu Leu Tyr Glu Thr Asn Glu Glu Leu Pro Pro Glu Glu Ser
 450 455 460
 Thr Gly Ser Ser Thr His Arg Leu Ser His Leu Thr Phe Phe Ser Phe
 465 470 475 480

Gln Thr Asn Gln Ala Gly Ser Ile Ala Asn Ala Gly Ser Leu Pro Thr
 485 490 495
 Tyr Leu Phe Thr Arg Arg Glu Leu Glu Leu Asn Asn Thr Ile Thr Pro
 500 505 510
 Asn Arg Ile Thr Gln Leu Pro Leu Leu Lys Ala Ser Ala Pro Leu Ser
 515 520 525
 Gly Thr Thr Leu Leu Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Gly Ile Leu
 530 535 540
 Arg Arg Thr Thr Asn Gly Thr Phe Gly Thr Leu Arg Leu Thr Leu Asn
 545 550 555 560
 Ser Pro Leu Thr Gln Gln Tyr Arg Leu Arg Leu Arg Phe Ala Ser Thr
 565 570 575
 Gly Asn Phe Ser Ile Arg Leu Leu Arg Gly Gly Leu Ser Ile Gly Glu
 580 585 590
 Leu Arg Leu Gly Ser Thr Met Asn Arg Gly Gln Glu Leu Thr Tyr Glu
 595 600 605
 Ser Phe Phe Thr Arg Glu Phe Thr Thr Thr Gly Pro Phe Asn Pro Pro
 610 615 620
 Phe Thr Phe Thr Gln Ala Gln Glu Ile Leu Thr Leu Asn Ala Glu Gly
 625 630 635 640
 Leu Ser Thr Gly Gly Glu Tyr Tyr Ile Glu Arg Ile Glu Ile Leu Pro
 645 650 655
 Leu Asn Pro Ala Arg Glu Ala Glu Glu Glu Leu Glu Ala Ala Lys Lys
 660 665 670

Ala

<210> 11

<211> 2019

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Cry9Ca1-25%

<226>

<227> CDS

<228> 1) .. (2019)

11 11

att tat tga aat aat caa aat gaa tat gaa att att gat gcc ccc cat 48
 Met Asn Arg Asn Asn Gln Asn Glu Tyr Glu Ile Ile Asp Ala Pro His
 5 10 15

tat ggg tgt cca tca gat gac gat gtg agg tat cct ttg gca agt gac 96
 Cys Gly Cys Pro Ser Asp Asp Asp Val Arg Tyr Pro Leu Ala Ser Asp
 20 25 30

cca aat gca gcg tta caa aat atg aac tat aaa gat tac tta caa atg	144
Pro Asn Ala Ala Leu Gln Asn Met Asn Tyr Lys Asp Tyr Leu Gln Met	
35 40 45	
aca gat gag gac tac act gat tct tat ata aat cct agt tta tct att	192
Thr Asp Glu Asp Tyr Thr Asp Ser Tyr Ile Asn Pro Ser Leu Ser Ile	
50 55 60	
agt ggt aga gaa gca tta cag act gcg ctt acg tta tta ggg aga ata	240
Ser Gly Arg Glu Ala Leu Gln Thr Ala Leu Thr Leu Leu Gly Arg Ile	
65 70 75 80	
ctc ggg gct tta ggt gtt ccg ttt tct gga caa ata tta agt ttt tat	288
Leu Gly Ala Leu Gly Val Pro Phe Ser Gly Gln Ile Leu Ser Phe Tyr	
85 90 95	
caa ttc ctt tta aat aca ctg tgg cca gtt aat gat aca gct ata tgg	336
Gln Phe Leu Leu Asn Thr Leu Trp Pro Val Asn Asp Thr Ala Ile Trp	
100 105 110	
gaa gct ttc atg cga cag gtg gag gaa ctt gtc aat caa caa ata aca	384
Glu Ala Phe Met Arg Gln Val Glu Glu Leu Val Asn Gln Gln Ile Thr	
115 120 125	
gaa ttt gca aga aat cag gca ctt gca aga ttg caa gga tta gga gaa	432
Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala Leu Ala Arg Leu Gln Gly Leu Gly Glu	
130 135 140	
tct ttt aat gta tat caa cgt tcc ctt caa aat tgg ttg gct gat cga	480
Ser Phe Asn Val Tyr Gln Arg Ser Leu Gln Asn Trp Leu Ala Asp Arg	
145 150 155 160	
aat gat aca cga aat tta agt tta tta cgt gct caa ttt ata gct tta	528
Asn Asp Thr Arg Asn Leu Ser Leu Leu Arg Ala Gln Phe Ile Ala Leu	
165 170 175	
gac ctt gat ttt gtt aat gct att cca ttg ttt gca gta aat gga cag	576
Asp Leu Asp Phe Val Asn Ala Ile Pro Leu Phe Ala Val Asn Gly Gln	
180 185 190	
cag gtt cca tta ctg tca gta tat gca caa gct tta aat tta cat ttg	624
Gln Val Pro Leu Leu Ser Val Tyr Ala Gln Ala Leu Asn Leu His Leu	
195 200 205	
tta tta tta aaa gaa gca tct ctt ttt gga gaa gga tgg gga ttc aca	672
Leu Leu Leu Lys Glu Ala Ser Leu Phe Gly Glu Gly Trp Gly Phe Thr	
210 215 220	
cag ggg gaa att tcc aca tat tat gaa cgt caa ttg gaa cta acc gct	720
Gln Gly Glu Ile Ser Thr Tyr Tyr Glu Arg Gln Leu Glu Leu Thr Ala	
225 230 235 240	
aag tac act aat tac tgt gaa tct tgg tat aat aca ggt tta gaa cgt	768
Lys Tyr Thr Asn Tyr Cys Gln Thr Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Glu Arg	
245 250 255	
tta aga gga acc aat act gaa tct ttt tta aga tat cat caa ttc cgt	816
Leu Arg Gly Thr Asn Thr Gln Ser Phe Leu Arg Tyr His Gln Phe Arg	
260 265 270	

aca gaa atg acc tta gtg gta tta gat gtt ggg ggg cta ttt cca tat	664
Arg Glu Met Thr Leu Val Val Leu Asp Val Val Ala Leu Phe Pro Tyr	
275 280 285	
tat gat gta cga ctt tat cca acg gga tca aac cca cag ctt aca cgt	912
Tyr Asp Val Arg Leu Tyr Pro Thr Gly Ser Asn Pro Gln Leu Thr Arg	
290 295 300	
gag gta tat aca gat ccg att gta ttt aat cca cca gct aat tta gga	960
Glu Val Tyr Thr Asp Pro Ile Val Phe Asn Pro Pro Ala Asn Leu Gly	
305 310 315 320	
ctt tgc cga cgt tgg ggt act aat ccc tat aat act ttt tct gag ctc	1008
Leu Cys Arg Arg Trp Gly Thr Asn Pro Tyr Asn Thr Phe Ser Glu Leu	
325 330 335	
gaa aat gcc ttc att cgc cca cca cat ctt ttt gaa agg ctg aat agc	1056
Glu Asn Ala Phe Ile Arg Pro Pro His Leu Phe Glu Arg Leu Asn Ser	
340 345 350	
tta aca atc agc agt aat cga ttt cca gtt tca tct aat ttt atg gaa	1104
Leu Thr Ile Ser Ser Asn Arg Phe Pro Val Ser Ser Asn Phe Met Glu	
355 360 365	
tat ttt tca gga cat acg tta cgc cgt agt tat ctg aac gat tca gca	1152
Tyr Phe Ser Gly His Thr Leu Arg Arg Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Ala	
370 375 380	
gta caa gaa gat agt tat ggc cta att aca acc aca aga gca aca att	1200
Val Gln Glu Asp Ser Tyr Gly Leu Ile Thr Thr Thr Arg Ala Thr Ile	
385 390 395 400	
aat ccc gga gtt gat gga aca aac cgc ata gag tca acg gca gta gat	1248
Asn Pro Gly Val Asp Gly Thr Asn Arg Ile Glu Ser Thr Ala Val Asp	
405 410 415	
ttt cgt tct gca ttg ata ggt ata tat ggc gtg aat aga gct tct ttt	1296
Phe Arg Ser Ala Leu Ile Gly Ile Tyr Gly Val Asn Arg Ala Ser Phe	
420 425 430	
gtc cca gga ggc ttg ttr aat ggt acg act tct cct gct aat gga gga	1344
Val Pro Gly Gly Leu Phe Asn Gly Thr Thr Ser Pro Ala Asn Gly Gly	
435 440 445	
tgt aga gat ctc tat gat aca aat gat gaa tta cca cca gat gaa agt	1392
Cys Arg Asp Leu Tyr Asp Thr Asn Asp Glu Leu Pro Pro Asp Glu Ser	
450 455 460	
acc gga agt tta acc cat aga cta tct cat tta acc ttt ttt agc ttt	1440
Thr Gly Ser Ser Thr His Arg Leu Ser His Leu Thr Phe Phe Ser Phe	
465 470 475 480	
taa act aat cca gct gga ttr ara gct aat gca gga agt gta cct act	1488
Asn Thr Asn Gln Ala Gly Ser Ile Ala Asn Ala Gly Ser Val Pro Thr	
485 490 495	
tat gtt taa acc agt gtt ttr tta gac ctt aat aat aag att acc cca	1536
Thr Val Trp Thr Arg Arg Arg Val Asp Leu Asn Asn Thr Ile Thr Pro	
500 505 510	
aat gga att act cca tta tta tgg gta aag gca tct gca cct gtt tgg	1584

Asn	Arg	Ile	Thr	Gln	Leu	Pro	Leu	Val	Lys	Ala	Ser	Ala	Pro	Val	Ser		
		515					520					525					
ggt	act	acg	gtc	tta	aaa	ggt	cca	gga	ttt	aca	gga	ggg	ggt	ata	ctc	1632	
Gly	Thr	Thr	Val	Leu	Lys	Gly	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	Gly	Gly	Ile	Leu		
		520				535					540						
cga	aga	aca	act	aat	ggc	aca	ttt	gga	acg	tta	aga	gta	acg	gtt	aat	1680	
Arg	Arg	Thr	Thr	Asn	Gly	Thr	Phe	Gly	Thr	Leu	Arg	Val	Thr	Val	Asn		
545					550					555					560		
tca	cca	tta	aca	caa	caa	tat	cgc	cta	aga	tta	cgt	ttt	gcc	tca	aca	1728	
Ser	Pro	Leu	Thr	Gln	Gln	Tyr	Arg	Leu	Arg	Leu	Arg	Phe	Ala	Ser	Thr		
				565					570					575			
gga	aat	ttc	agt	ata	agg	gta	ctc	cgt	gga	ggg	gtt	tct	atc	ggt	gat	1776	
Gly	Asn	Phe	Ser	Ile	Arg	Val	Leu	Arg	Gly	Gly	Val	Ser	Ile	Gly	Asp		
			580					585					590				
gtt	aga	tta	ggg	agc	aca	atg	aac	aga	ggg	cag	gaa	cta	act	tac	gaa	1824	
Val	Arg	Leu	Gly	Ser	Thr	Met	Asn	Arg	Gly	Gln	Glu	Ileu	Thr	Tyr	Glu		
		595					600					605					
tcc	ttt	ttc	aca	aga	gag	ttt	act	act	act	ggt	ccg	ttc	aat	ccg	cct	1872	
Ser	Phe	Phe	Thr	Arg	Glu	Phe	Thr	Thr	Thr	Gly	Pro	Phe	Asn	Pro	Pro		
	610					615					620						
ttt	aca	ttt	aca	caa	gct	caa	gag	att	cta	aca	gtg	aat	gca	gaa	ggt	1920	
Phe	Thr	Phe	Thr	Gln	Ala	Gln	Glu	Ile	Leu	Thr	Val	Asn	Ala	Glu	Gly		
					630					635				640			
gtt	agc	acc	ggt	ggt	gaa	tat	tat	ata	gat	aga	att	gaa	att	gtc	cct	1968	
Val	Ser	Thr	Gly	Gly	Glu	Tyr	Tyr	Ile	Asp	Arg	Ile	Glu	Ile	Val	Pro		
				645					650					655			
gtg	aat	ccg	gca	cga	gaa	gcg	gaa	gag	gat	tta	gaa	gcg	gcg	aag	aaa	2016	
Val	Asn	Pro	Ala	Arg	Glu	Ala	Glu	Glu	Asp	Leu	Glu	Ala	Ala	Lys	Lys		
			660				665						670				
gcg																2019	
Ala																	

<210> 12

<211> 673

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle: Cry9Cal-25%

<400> 12

Met	Asn	Arg	Asn	Asn	Gln	Asn	Glu	Tyr	Glu	Ile	Ile	Asp	Ala	Pro	His
1				5					10					15	

Cys	Gly	Cys	Pro	Ser	Asp	Asp	Asp	Val	Arg	Tyr	Pro	Leu	Ala	Ser	Asp
			20					25					30		

Pro	Asn	Ala	Ala	Leu	Gln	Asn	Met	Asn	Tyr	Lys	Asp	Tyr	Leu	Gln	Met
		35					40					45			

Thr	Asp	Glu	Asp	Tyr	Thr	Asp	Ser	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Leu	Ser	Ile
	50					55					60				

Ser Gly Arg Glu Ala Leu Gln Thr Ala Leu Thr Leu Leu Gly Arg Ile
 65 70 75 80
 Leu Gly Ala Leu Gly Val Pro Phe Ser Gly Gln Ile Leu Ser Phe Tyr
 85 90 95
 Gln Phe Leu Leu Asn Thr Leu Trp Pro Val Asn Asp Thr Ala Ile Trp
 100 105 110
 Glu Ala Phe Met Arg Gln Val Glu Glu Leu Val Asn Gln Gln Ile Thr
 115 120 125
 Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala Leu Ala Arg Leu Gln Gly Leu Gly Glu
 130 135 140
 Ser Phe Asn Val Tyr Gln Arg Ser Leu Gln Asn Trp Leu Ala Asp Arg
 145 150 155 160
 Asn Asp Thr Arg Asn Leu Ser Leu Leu Arg Ala Gln Phe Ile Ala Leu
 165 170 175
 Asp Leu Asp Phe Val Asn Ala Ile Pro Leu Phe Ala Val Asn Gly Gln
 180 185 190
 Gln Val Pro Leu Leu Ser Val Tyr Ala Gln Ala Leu Asn Leu His Leu
 195 200 205
 Leu Leu Leu Lys Glu Ala Ser Leu Phe Gly Glu Gly Trp Gly Phe Thr
 210 215 220
 Gln Gly Glu Ile Ser Thr Tyr Tyr Glu Arg Gln Leu Glu Leu Thr Ala
 225 230 235 240
 Lys Tyr Thr Asn Tyr Cys Glu Thr Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Glu Arg
 245 250 255
 Leu Arg Gly Thr Asn Thr Glu Ser Phe Leu Arg Tyr His Gln Phe Arg
 260 265 270
 Arg Glu Met Thr Leu Val Val Leu Asp Val Val Ala Leu Phe Pro Tyr
 275 280 285
 Tyr Asp Val Arg Leu Tyr Pro Thr Gly Ser Asn Pro Gln Leu Thr Arg
 290 295 300
 Glu Val Tyr Thr Asp Pro Ile Val Phe Asn Pro Pro Ala Asn Leu Gly
 305 310 315 320
 Leu Cys Arg Arg Trp Gly Thr Asn Pro Tyr Asn Thr Phe Ser Glu Leu
 325 330 335
 Gln Asn Ala Phe Ile Arg Pro Pro His Leu Phe Glu Arg Leu Asn Ser
 340 345 350
 Leu Thr Ile Ser Ser Asn Arg Phe Pro Val Ser Ser Asn Phe Met Glu
 355 360 365
 Tyr Phe Ser Gly His Thr Leu Arg Arg Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Ala
 370 375 380

Val Gln Glu Asp Ser Tyr Gly Leu Ile Thr Thr Thr Arg Ala Thr Ile
 385 390 395 400
 Asn Pro Gly Val Asp Gly Thr Asn Arg Ile Glu Ser Thr Ala Val Asp
 405 410 415
 Phe Arg Ser Ala Leu Ile Gly Ile Tyr Gly Val Asn Arg Ala Ser Phe
 420 425 430
 Val Pro Gly Gly Leu Phe Asn Gly Thr Thr Ser Pro Ala Asn Gly Gly
 435 440 445
 Cys Arg Asp Leu Tyr Asp Thr Asn Asp Glu Leu Pro Pro Asp Glu Ser
 450 455 460
 Thr Gly Ser Ser Thr His Arg Leu Ser His Leu Thr Phe Phe Ser Phe
 465 470 475 480
 Gln Thr Asn Gln Ala Gly Ser Ile Ala Asn Ala Gly Ser Val Pro Thr
 485 490 495
 Tyr Val Trp Thr Arg Arg Asp Val Asp Leu Asn Asn Thr Ile Thr Pro
 500 505 510
 Asn Arg Ile Thr Gln Leu Pro Leu Val Lys Ala Ser Ala Pro Val Ser
 515 520 525
 Gly Thr Thr Val Leu Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Gly Ile Leu
 530 535 540
 Arg Arg Thr Thr Asn Gly Thr Phe Gly Thr Leu Arg Val Thr Val Asn
 545 550 555 560
 Ser Pro Leu Thr Gln Gln Tyr Arg Leu Arg Leu Arg Phe Ala Ser Thr
 565 570 575
 Gly Asn Phe Ser Ile Arg Val Leu Arg Gly Gly Val Ser Ile Gly Asp
 580 585 590
 Val Arg Leu Gly Ser Thr Met Asn Arg Gly Gln Glu Leu Thr Tyr Glu
 595 600 605
 Ser Phe Phe Thr Arg Glu Phe Thr Thr Thr Gly Pro Phe Asn Pro Pro
 610 615 620
 Phe Thr Phe Thr Gln Ala Gln Glu Ile Leu Thr Val Asn Ala Glu Gly
 625 630 635 640
 Val Ser Thr Gly Gly Glu Tyr Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Ile Val Pro
 645 650 655
 Val Asn Pro Ala Arg Glu Ala Glu Glu Asp Leu Glu Ala Ala Lys Lys
 660 665 670
 Ala

<210> 13

<211> 33

```

<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: mutant 1

<400> 13
gaattaaatg aatttttaaa tttaagtgtt          30

<210> 14
<211> 30
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: mutant 2

<400> 14
gaattaaatg aattattaaa tttaagtgtt          30

<210> 15
<211> 30
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: mutant 3

<400> 15
gaattattag aatttttatt attaagtgtt          30

<210> 16
<211> 30
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: mutant 4

<400> 16
gaattattag aattattatt attaagtgtt          30

<210> 17
<211> 30
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: mutant 5

<400> 17
gaattattag aagaattatt atttaatttt          30

<210> 18
<211> 30
<212> ADN

```


<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 6

<400> 18

gaacgattag aatttttatt attaagtgt

30

<210> 19

<211> 30

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 7

<400> 19

gaacgattag aattattatt attaagtgtt

30

<210> 20

<211> 30

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 8

<400> 20

gaattagaag aattattatt attaagtgtt

30

<210> 21

<211> 30

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 9

<400> 21

gaattattag aagaagaaga attaagtgtt

30

<210> 22

<211> 33

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 10

<400> 22

ttttatttaa atttattttt ttatattt attt

33

<210> 23

<211> 33

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant11

<400> 23

tttttatttaa atttagaaga attaccatta ctg

33

<210> 24

<211> 33

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 12

<400> 24

tttgaagaaa atttagaaga attaccatta ctg

33

<210> 25

<211> 33

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 13

<400> 25

tttgaagaaa atttttttatt atttccatta ctg

33

<210> 26

<211> 33

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 14

<400> 26

tttgaagaaa attttgaaga atttccatta ctg

33

<210> 27

<211> 33

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 15

<400> 27

tttttatttaa attttgaaga atttccatta ctg

33

<210> 28

<211> 33

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 16

<400> 28

tttttattaa atgaattttt tgaaccatta ctg

33

<210> 29

<211> 24

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 17

<400> 29

cttttttttag aattattttt attc

24

<210> 30

<211> 24

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 18

<400> 30

cttttttttat tattattttt attc

24

<210> 31

<211> 24

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 19

<400> 31

cttttttttag aagaatttga atta

24

<210> 32

<211> 24

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 20

<400> 32

ctttttgaag aagaatttga atta

24

<210> 33

<211> 24

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 21

<400> 33

ctttttgaag aattatttga agaa

24

<210> 34

<211> 15

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 22

<400> 34

ttattagaat taaat

15

<210> 35

<211> 15

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 23

<400> 35

ttattatttt taaat

15

<210> 36

<211> 15

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 24

<400> 36

ttagaattat taaat

15

<210> 37

<211> 15

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 25

<400> 37

ttattatttt ttaat

15

<210> 38

<211> 15

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 26

<400> 38
ttagaagaat taaat

15

<210> 39
<211> 15
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: mutant 27

<400> 39
ttagaatttt taaat

15

<210> 40
<211> 15
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: mutant 28

<400> 40
ttagaatttg aaaat

15

<210> 41
<211> 15
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: mutant 29

<400> 41
ttagaagaag aaaat

15

<210> 42
<211> 33
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 1

<400> 42
gatccaaatg ataccattaaa tttaacngtt gtt

33

<210> 43
<211> 31
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:

oligonucléotide 2

<400> 43
 gatcgaaatg atacatttaa ttaagtgtt gtt 33

<210> 44
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide 3

<400> 44
 gatcgaaatg atacagaaaa ttaagtgtt gtt 33

<210> 45
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide 4

<400> 45
 cgaaatgata cagcattatt aagtgttggt cgt 33

<210> 46
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide 5

<400> 46
 cgaaatgata cagcagaatt aagtgttggt cgt 33

<210> 47
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide 6

<400> 47
 ctggtggtt ccaatgaatt tttaattttt agtgttggt 39

<210> 48
 <211> 33
 <212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 7

<400> 48

ttggctgac gaaatgaatt tttattatta agtgttggt

39

<210> 49

<211> 39

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 8

<400> 49

ttggctgac gaaatgaatt attaaattta agtgttggt

39

<210> 50

<211> 39

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 9

<400> 50

ttggctgac gaaatgaatt attattatta agtgttggt

39

<210> 51

<211> 39

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 10

<400> 51

ttggctgac gaaatgaaga agaagaatta agtgttggt

39

<210> 52

<211> 39

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 11

<400> 52

ttggctgac gaaatgaaga attattatta agtgttggt

39

<210> 53
<211> 36
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 12

<400> 53
caaaattggt tggctgaatt aaatgaatta ttaaatt 36

<210> 54
<211> 36
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 13

<400> 54
caaaattggt tggctgaatt aaatgaattt ttaaatt 36

<210> 55
<211> 39
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 14

<400> 55
caaaattggt tggctgaatt attagaattt ttattatta 39

<210> 56
<211> 39
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 15

<400> 56
caaaattggt tggctgaatt attagaatta ttattatta 39

<210> 57
<211> 39
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 16

<400> 57
caaaattggt tggctgaatt attagaagaa ttattatta

39

<210> 58
<211> 39
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 17

<400> 58
caaaattggt tggctgaacg attagaattt ttattatta

39

<210> 59
<211> 39
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 18 ;

<400> 59
caaaattggt tggctgaacg attagaatta ttattatta

39

<210> 60
<211> 39
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 19

<400> 60
caaaattggt tggctgaatt agaagaatta ttattatta

39

<210> 61
<211> 39
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 20

<400> 61
caaaattggt tggctgaatt attagaagaa gaagaatta

39

<210> 61
<211> 39
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 21

<400> 62

gctattccat tgttttatt aaatggacag caggtt

36

<210> 63

<211> 36

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 22

<400> 63

gctattccat tgtttgaaga aaatggacag caggtt

36

<210> 64

<211> 36

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 23

<400> 64

ttattaaatg gacagcagtt accattactg tcagta

36

<210> 65

<211> 36

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 24

<400> 65

ttattaaatg gacagcagtt tccattactg tcagta

36

<210> 66

<211> 36

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 25

<400> 66

ttattaaatg gacagcagga accattactg tcagta

36

<210> 67
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide 26

<400> 67
 gaagaaaatg gacagcagtt accattactg tcagta 36

<210> 68
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide 27

<400> 68
 gaagaaaatg gacagcagtt tccattactg tcagta 36

<210> 69
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide 28

<400> 69
 ccattgtttt tattaaattt attttttta ccattactgt cagta 45

<210> 70
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide 29

<400> 70
 ccattgtttt tattaaattt agaaattta ccattactgt cagta 45

<210> 71
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide 30

<400> 71
ccattgtttg aagaaaattt agaagaatta ccattactgt cagta 45

<210> 72
<211> 45
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 31

<400> 72
ccattgtttg aagaaaattt ttatattt ccattactgt cagta 45

<210> 73
<211> 45
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 32

<400> 73
ccattgtttg aagaaaattt tgaagaattt ccattactgt cagta 45

<210> 74
<211> 45
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 33

<400> 74
ccattgtttt tattaaattt tgaagaattt ccattactgt cagta 45

<210> 75
<211> 45
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 34

<400> 75
ccattgtttt tattaaatga atctttgaa ccattactgt cagta 45

<210> 76
<211> 45
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 35

<400> 76

gatgcatctc tttttttaga aggatgggga ttc

33

<210> 77

<211> 36

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 36

<400> 77

gatgcatctc tttttttatt aggatgggga ttcaca

36

<210> 78

<211> 33

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 37

<400> 78

gatgcatctc tttttgaaga aggatgggga ttc

33

<210> 79

<211> 33

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 38

<400> 79

ttagaaggat ggggattaac acagggggaa att

33

<210> 80

<211> 33

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 39

<400> 80

aaacaaat aggggaaac acaggggaa att

33

<210> 81

<211> 45
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 40

<400> 81
gcatctcttt ttttagaatt atttttattc acacaggggg aaatt

45

<210> 82
<211> 45
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 41

<400> 82
gcatctcttt ttttattatt atttttattc acacaggggg aaatt

45

<210> 83
<211> 45
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 42

<400> 83
gcatctcttt ttttagaatt atttttattc acacaggggg aaatt

45

<210> 84
<211> 45
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 43

<400> 84
gcatctcttt ttgaagaatt atttttattc acacaggggg aaatt

45

<210> 85
<211> 45
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 44

<400> 85

gcacatctcttt ttgaaqaatt attttttagaa acacaggggg aaatt

49

<210> 86

<211> 39

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 45

<400> 86

ggttttagatc gtttattaga attaaatact gaaagttgg

39

<210> 87

<211> 39

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 46

<400> 87

ggttttagatc gtttattatt ttttaaatact gaaagttgg

39

<210> 88

<211> 39

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 47

<400> 88

ggttttagatc gtttagaatt attaaatact gaaagttgg

39

<210> 89

<211> 39

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 48

<400> 89

ggttttagatc gtttattatt ttttaatact gaaagttgg

39

<210> 90

<211> 39

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 49

<400> 90

ggtttagatc gtttagaaga attaaatact gaaagttgg

39

<210> 91

<211> 39

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 50

<400> 91

ggtttagatc gtttagaatt tttaaatact gaaagttgg

39

<210> 92

<211> 39

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 51

<400> 92

ggtttagatc gtttagaatt tgaaaatact gaaagttgg

39

<210> 93

<211> 39

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 52

<400> 93

ggtttagatc gtttagaaga agaaaatact gaaagttgg

39

<210> 94

<211> 30

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 53

<400> 94

ggatcagaa attatagaag ccccccattg

30

<210> 95

<211> 40

<212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide 54

 <400> 95
 tgggtgtcca tcagaagaag aattaaggga tcctttggca 40

 <210> 96
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide 55

 <400> 96
 tcctttggca agtgaaccaa atgcagc 27

 <210> 97
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide 56

 <400> 97
 gaactataaa gaatacttac aaatg 25

 <210> 98
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide 57

 <400> 98
 caaatgacag aagaggaata cactga 26

 <210> 99
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide 58

 <400> 99
 taccatgaat ctatctttaa 20

<210> 100
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide 59

 <400> 100
 tattagtggg agagaagcat tacagactgc gcttac 36

 <210> 101
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide 60

 <400> 101
 cagactgcgc ttactgttat tagggagaat actcggg 37

 <210> 102
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide 61

 <400> 102
 gggctttagg ttaccggtt totgg 25

 <210> 103
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide 62

 <400> 103
 ttgggacaa ttattagtt ttatcaa 28

 <210> 104
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:

oligonucléotide 63

<400> 104
cttttaaata cactgtttcc attaaatgaa acagctatat

40

<210> 105
<211> 24
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 64

<400> 105
acagctatat ttgaagcttt catg

24

<210> 106
<211> 26
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 65

<400> 106
ctttcatgcg acagtttagag gaactt

26

<210> 107
<211> 26
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 66

<400> 107
gaggaacttt taaatcaaca aataac

26

<210> 108
<211> 21
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 67

<400> 108
cgattaggag aatcttttaa t

21

<210> 109
<211> 23
<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 63

<400> 109

tcttttaatt tatatcaacg ttc

23

<210> 110

<211> 21

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 63

<400> 110

ccctcaaaaat tttttggctg a

21

<210> 111

<211> 17

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 70

<400> 111

ttggctgaac gaaatga

17

<210> 112

<211> 23

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 71

<400> 112

cgaatgaaa cacgaaattt aag

23

<210> 113

<211> 37

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 72

<400> 113

ctctcaatt taattttatt acgtgtctaa tttatag

37

<210> 114
<211> 48
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 73

<400> 114
gctcaattta tagctttaga acttgaattt ttaaattgcta ttccattg

48

<210> 115
<211> 27
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 74

<400> 115
ccattgtttg cattaaatgg acagcag

27

<210> 116
<211> 27
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 75

<400> 116
ccattgtttg cattaaatgg acagcag

27

<210> 117
<211> 27
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 76

<400> 117
ccattactgt cattatatga acaagct

27

<210> 118
<211> 27
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 77

<400> 118
tctgtacaaq ctttctattt acatttg 27

<210> 119
<211> 21
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 78

<400> 119
ttattaaaag aagcatctct ttt 23

<210> 120
<211> 25
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 79

<400> 120
tggagaagga ttgttgattca cacag 25

<210> 121
<211> 24
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 80

<400> 121
cacatattat gacattcaat tggg 24

<210> 122
<211> 28
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 81

<400> 122
tactttgga. tttttttttt tttcattt 26

<210> 123
<211> 25
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 82

<400> 123

tacaggttta gaacgtttaa gagga

25

<210> 124

<211> 26

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 83

<400> 124

aatactgaaa gttttttaag atatcatc

28

<210> 125

<211> 51

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 84

<400> 125

gtagagaaat gactttatta ttattagaat tattagcgct atttccatat t

51

<210> 126

<211> 27

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 85

<400> 126

atattatgaa ttacgacttt atccaac

27

<210> 127

<211> 23

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 86

<400> 127

cttacacgtg agttatatac aga

23

<210> 128
<211> 29
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 87

<400> 128
tatacagaac cgatttttatt taatccacc

29

<210> 129
<211> 28
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 88

<400> 129
ccaccagcta atttaggact ttgccgac

28

<210> 130
<211> 27
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 89

<400> 130
ctttgccgac gttttgtac taatccc

27

<210> 131
<211> 23
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 90

<400> 131
catctttttg aaaggctgaa tag

23

<210> 132
<211> 30
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 91

<400> 132
taatcgattt ccattatcat ctaattttat

30

<210> 133
<211> 36
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 92

<400> 133
ctaattttat ggaatatttt tcaggacata cgttac

36

<210> 134
<211> 33
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 93

<400> 134
tagttatctg aacgaatcag cattacaaga aga

33

<210> 135
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 94

<400> 135
caagaagaaa gttatggcct

20

<210> 136
<211> 35
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 95

<400> 136
caattaatcc cggattagaa ggaacaaacc gcata

35

<210> 137
<211> 30
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 96

<400> 137

gagtcacgg cattagaatt tcgttctgca

30

<210> 138

<211> 26

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 97

<400> 138

ggtatatatg gcttaaataag agcttc

26

<210> 139

<211> 30

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 98

<400> 139

tagagcttct tttttaccag gaggcttggt

30

<210> 140

<211> 31

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 99

<400> 140

ctgctaattgg aggatgtaga gaactctatg a

31

<210> 141

<211> 17

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 100

<400> 141

ctctatgaaa caaatga

17

<210> 142

<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 101

<400> 142
acaaatgaag aattaccacc

20

<210> 143
<211> 27
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 102

<400> 143
attaccacca gaagaaagta ccggaag

27

<210> 144
<211> 30
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 103

<400> 144
agactatctc atttaacctt ttttagcttt

30

<210> 145
<211> 27
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 104

<400> 145
gctaatagcag gaagtttacc tacttat

27

<210> 146
<211> 26
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 105

<400> 146

cctacttatt tatttacccg tcgtga

26

<210> 147

<211> 33

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 106

<400> 147

acccgtcgtg aattagaact taataatagc att

33

<210> 148

<211> 24

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 107

<400> 148

attaccattg ttaaaggcat ctgc

24

<210> 149

<211> 30

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 108

<400> 149

aaggcatctg cacctttatc gggactacg

30

<210> 150

<211> 29

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 109

<400> 150

tcgggtacta cgttattaaa aggtccagg

29

<210> 151

<211> 40

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 110

<400> 151
acatttgga cgttaagatt aacgttaaatt tcaccattaa

40

<210> 152
<211> 37
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 111

<400> 152
cacaacaata tcgcctaaga ttacgttttg cctcaac

37

<210> 153
<211> 31
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 112

<400> 153
aaatttcagt ataaggttac tccgtggagg g

31

<210> 154
<211> 35
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 113

<400> 154
ataagggtac tccgtggagg gttatctatc ggtga

35

<210> 155
<211> 29
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 114

<400> 155
tctatcggtg aattaagatt agggagcac

29

<210> 156
<211> 30

<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 115

<400> 156
caagagattc taacattaaa tgcagaaggt

30

<210> 157
<211> 32
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 116

<400> 157
aatgcagaag gtttaagcac cgggtggtgaa ta

32

<210> 158
<211> 32
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 117

<400> 158
gtggtgaata ttatatagaa agaattgaaa tt

32

<210> 159
<211> 37
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 118

<400> 159
agaattgaaa ttttaccttt aaatccggca cgagaag

37

<210> 160
<211> 30
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 119

<400> 160
cgagaagcgg aagaggaatt agaagcggcg

30



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI




N° 11 235*02

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 1.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		PM 01008	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0103691	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Toxine insecticide de Bacillus thuringiensis modifiée sensible à la pepsine			
LE(S) DEMANDEUR(S) : Aventis CropScience S.A.			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		FREYSSINET	
Prénoms		Georges	
Adresse	Rue	21 Rue de Nervieux	
	Code postal et ville	69450	St. CYR AU MONT D'OR
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		RANG	
Prénoms		Cécile	
Adresse	Rue	1, rue des Alicantes	
	Code postal et ville	34680	St Georges d'Orques
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		FRUTOS	
Prénoms		Roger	
Adresse	Rue	1, rue des Alicantes	
	Code postal et ville	34680	St Georges d'Orques
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Lyon, le 30 août 2001			
Hervé MONCONDUIT			

